



UNIVERSITÀ DI PISA

IN SUPREMAE DIGNITATIS – UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Farmacia

Corso di Laurea magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

**Farmacologia e strategie terapeutiche della discinesia
indotta da l-DOPA nel Morbo di Parkinson: studi
clinici e preclinici**

Relatore: Dr. Stefano Fogli

Candidato: Simona Radatti

A.A 2014/2015

INDICE

1. INTRODUZIONE	4
2. ORGANIZZAZIONE FUNZIONALE DEI GANGLI DELLA BASE	5
2.1 LOCALIZZAZIONE ANATOMICA E SUDDIVISIONE	5
2.2 FISILOGIA	6
2.2.1 LA VIA DIRETTA	7
2.2.2. LA VIA INDIRETTA.....	8
3. FARMACI ANTIPARKINSON	9
3.1 Levodopa	9
3.2 Agonisti dopaminergici.....	11
3.2.1 Derivati della segale cornuta.....	11
3.2.2 Agonisti non ergolinici della dopamina.....	11
3.3 Inibitori delle monoaminossidasi	12
3.4 Inibitori della catecol-o-metil-transferasi	13
3.5 Altri farmaci.....	13
3.5.1 Apomorfina	13
3.5.2 Amantadina.....	13
3.5.3 Farmaci anticolinergici	14
4. FARMACOLOGIA DELLA DISCINESIA INDOTTA DA L-DOPA E RELATIVE STRATEGIE TERAPEUTICHE	15
4.1 Tipi di discinesie	15
4.2 Epidemiologia	16
4.3 Il sistema dopaminergico	17
4.3.1 Recettori dopaminergici.....	17
4.3.2. Deplezione della dopamina striatale	22
4.3.3 Rilascio pulsatile di dopamina	22
4.4 Il sistema glutammatergico	24
4.4.1 Recettori ionotropici NMDA	25
4.4.2 Recettori ionotropici AMPA.....	30
4.4.3 Recettori ionotropici del Kainato.....	34
4.4.4 Recettori metabotropici per il glutammato	34
4.4.5 Rilascio del glutammato	38
4.5 Il sistema oppioide	41
4.5.1 Preproencefalina e preprodinorfina	42
4.5.2 Nocicettina / Orfanina FQ.....	47
4.5.3 Recettori oppioidi	50
4.6 Il sistema serotoninergico	59
4.6.1 I recettori serotoninergici 5-HT _{1A} e 5-HT _{1B}	61
4.6.2 I recettori serotoninergici 5-HT ₂	72
4.6.3 Il trasportatore della serotonina (SERT)	76
4.7 Il sistema GABAergico.....	78
4.8 Il sistema adenosinico	81
4.9 Il sistema cannabinoide.....	85
4.9.1 I recettori cannabinoidi	85
4.10 Il sistema adrenergico	94
4.11 Il Sistema istaminergico.....	101
4.12 La trasmissione colinergica	104
4.13 La trasmissione tachichinergica	108
4.14 Fattori di trascrizione e segnali intracellulari	111

4.15 Concetti emergenti nella discinesia	115
4.15.1 Angiogenesi e barriera emato-encefalica.....	115
4.15.2 Infiammazione	118
4.15.3 Acidi Grassi	119
4.15.4 Esocitosi.....	121
4.15.5 Ormone di rilascio della tireotropina (TRH)	123
4.15.6 NO sintasi	124
5. CONCLUSIONI	126
6. BIBLIOGRAFIA	129
RINGRAZIAMENTI.....	143

1. INTRODUZIONE

Questa tesi ha come obiettivo quello di indagare sui possibili meccanismi alla base della discinesia indotta da l-DOPA (LID) e di conseguenza sulle possibili strategie terapeutiche da intraprendere per antagonizzare questo debilitante effetto collaterale.

La L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L- DOPA) è ad oggi il farmaco più efficace nel trattamento del Morbo di Parkinson in quanto è un intermedio della via di biosintesi della Dopamina, neurotrasmettitore la cui deplezione a livello della substantia nigra porta alla suddetta patologia. Il trattamento a lungo termine con la levodopa nei pazienti affetti da Morbo di Parkinson è complicato dall'insorgere in molti di essi, di movimenti anomali involontari (AIMs), differenti dal tremore tipico della malattia, che compromettono la qualità di vita, già alquanto precaria, di queste persone.

Il percorso da me intrapreso è partito dallo studio dei meccanismi e dei sintomi riguardanti la LID per poi analizzare gli studi clinici e preclinici che intendono confermare, confutare o modificare, le teorie e le ipotesi avanzate circa la sua fisiopatologia.

Nella ricerca delle informazioni ho interrogato la banca dati PubMed per analizzare gli studi e le review più recenti, inserendo le parole chiave "dyskinesia" e "Parkinson's Disease".

Nella stesura del lavoro sono partita dalla descrizione in generale dell'organizzazione dei gangli della base per passare successivamente ad analizzare, uno alla volta, tutti i sistemi coinvolti nella fisiopatologia della discinesia indotta da l-DOPA.

Ho quindi concluso lo scritto riepilogando quello che ad oggi si conosce sui meccanismi che conducono allo sviluppo delle discinesie dopo ripetuta somministrazione di l-DOPA e mostrando quali potrebbero essere i sistemi per contrastare questo fenomeno, sia farmacologici sia non farmacologici.

2. ORGANIZZAZIONE FUNZIONALE DEI GANGLI DELLA BASE

2.1 LOCALIZZAZIONE ANATOMICA E SUDDIVISIONE

I gangli della base (detti anche nuclei della base) sono un gruppo di nuclei telencefalici, formati da sostanza grigia e contornati da sostanza bianca subcorticale. Essi si suddividono in : *corpo striato*, formato da nucleo caudato, putamen e globus pallidus a sua volta suddiviso in globus pallidus esterno (GPe) e globus pallidus interno (GPi) ; *substantia nigra* composta da una pars compacta (SNc) e da una pars reticulata (SNr); *nucleo subtalamico* (STN).

Il *corpo striato* prende il nome dalla presenza di formazioni grigie intersecate da fasci di fibre mieliniche che nel loro insieme formano il sistema delle capsule. Il nucleo caudato ha la forma di una virgola e si trova in posizione supero-mediale. Vi si riconoscono un'estremità arrotondata anteriore denominata "testa" situata di fronte al talamo, un "corpo" intermedio compreso tra il pavimento del corno anteriore del ventricolo laterale e la capsula interna, e infine una "coda" che giunge nel lobo temporale per terminare all'altezza dell'amigdala.

Il putamen e il globus pallidus formano il nucleo lenticolare che è situato al di sotto e lateralmente rispetto al nucleo caudato. Il putamen ha una colore grigio-intenso e costituisce la base del nucleo lenticolare, al suo interno invece il globus pallidus ha una colorazione più chiara e forma l'apice rivolto verso il basso del nucleo lenticolare. Il corpo striato nel suo insieme è caratterizzato da un'elevata densità neuronale e da un'abbondante vascolarizzazione, sebbene il globus pallidus abbia una densità più bassa e le sue cellule risultino morfologicamente simili a quelle della substantia nigra. La popolazione neuronale maggiormente presente a livello del

nucleo caudato e del putamen è rappresentata da cellule GABA-ergiche medie spinose: il termine medie indica le loro dimensioni intermedie mentre l'aggettivo spinose indica l'elevato numero di spine dendritiche attraverso cui questi neuroni si collegano sinapticamente alle proiezioni talamiche e corticali.

La *substantia nigra* è un esteso nucleo mesencefalico, presenta una forma semilunare ed è localizzata tra tegmento e peduncolo. La sua colorazione bruna è dovuta al fatto che i neuroni da cui è formata sono, nell'uomo, fortemente pigmentati per la presenza di neuromelanina. La pars compacta rappresenta la zona dorsale e laterale ed è ricca in neuroni dopaminergici, mentre la zona ventrale costituisce la pars reticulata e contiene neuroni GABA-ergici. La SN riceve fibre dalla corteccia cerebrale e dal globus pallidus e si collega alla corteccia motoria, trovandosi così lungo il decorso delle vie extrapiramidali.

Il *nucleo subtalamico* ha un aspetto lentiforme e si trova nella parte caudale del diencefalo, in posizione mediale rispetto alla capsula interna e ventralmente alla zona incerta. Le afferenze arrivano dal globus pallidus tramite il fascicolo subtalamico e dalla corteccia frontale, mentre le efferenze si dirigono verso il globus pallidus omo- e contro laterale e verso la substantia nigra. I neuroni del nucleo subtalamico utilizzano come neurotrasmettitore l'aminoacido eccitatorio glutammato (Gesi *et al.*, 2007).

2.2 FISIOLOGIA

Per descrivere la fisiologia di questo sistema farò riferimento al modello classico di organizzazione funzionale dei gangli della base (**Figura 1**). La corteccia cerebrale dirige allo striato gli input eccitatori dando origine alle proiezioni cortico-striatali che utilizzano come principale neurotrasmettitore il glutammato. Questi input ricevono una modulazione

ad opera delle proiezioni dopaminergiche nigro-striatali provenienti dalla pars compacta della substantia nigra e delle cellule serotoninergiche del raphe dorsale del tronco encefalico.

Gli output dei gangli della base sono invece rappresentati dal globus pallidus e dalla pars reticulata della substantia nigra e sono di tipo inibitorio per ridurre la scarica neuronale dei nuclei talamici di proiezione alla corteccia encefalica. I circuiti pallido-talamici e nigro-talamici giungono per la maggior parte alle aree motorie della corteccia, andando quindi a influenzare il movimento.

I sistemi di input e output dei gangli della base vedono la loro realizzazione secondo due circuiti: la via diretta e la via indiretta.

I due circuiti si controllano a vicenda in quanto la via diretta facilita i movimenti volontari e i movimenti motori protratti, mentre la via indiretta inibisce tali movimenti.

2.2.1 LA VIA DIRETTA

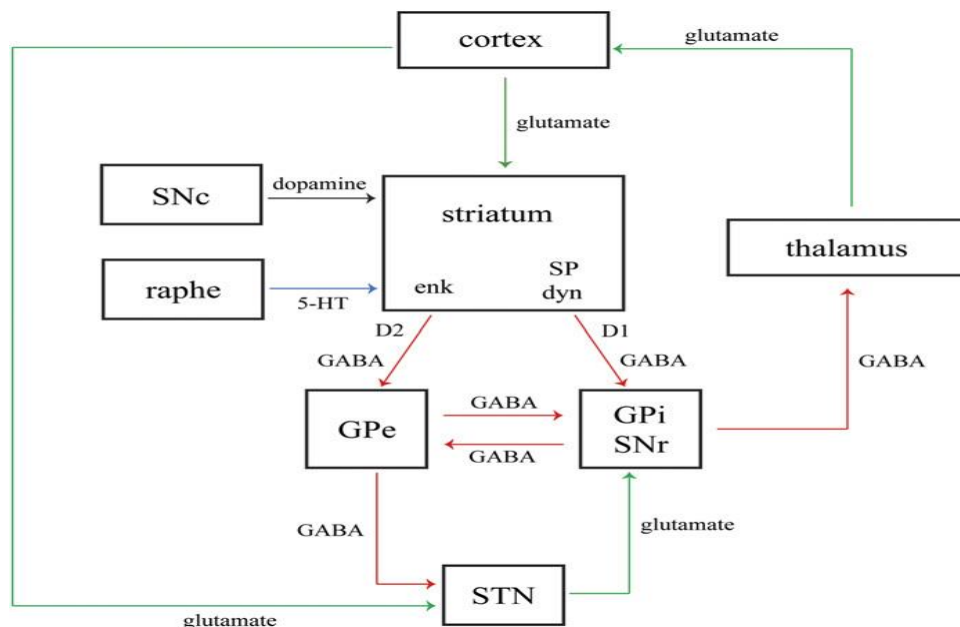


Figura 1. Organizzazione funzionale dei gangli della base. Le linee verdi indicano la trasmissione eccitatoria glutammatergica, mentre le linee rosse indicano la trasmissione inibitoria GABAergica. Fonte: Huot, P., Johnston, T.H., Koprich, J.B., Fox, S.H., Brotchie, J.M., 2013a. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacological reviews* 65, 171-222.

La via diretta unisce lo striato al segmento interno del globus pallidus e alla pars reticulata della substantia nigra tramite neuroni GABA-ergici contenenti sostanza P e dinorfina e che esprimono sui loro terminali assonici o dendritici recettori dopaminergici D_1 . Tali recettori sembrano modulare il rilascio di GABA dalle vie striato-nigrali e striato-pallidali, di fatti se l'attività di questa via aumenta, si riduce o si arresta del tutto il controllo inibitorio che queste due vie esercitano sul talamo, il quale può di conseguenza esercitare il suo effetto eccitatorio sulla corteccia facilitando l'attività motoria volontaria.

2.2.2. LA VIA INDIRECTA

In questa via i neuroni GABA-ergici provenienti dallo striato terminano sul segmento esterno del globus pallidus, il quale invia segnali GABA-ergici al nucleo subtalamico. A differenza della via diretta, questi neuroni contengono encefalina e esprimono sulle loro terminazioni recettori dopaminergici D_2 . Il nucleo subtalamico così stimolato, invia a sua volta fibre glutammatergiche verso le strutture di output, sopra descritte, dei gangli della base. In questo modo si assiste a un feedback negativo sulla corteccia che si riflette in una riduzione dell'attività motoria.

Sulle due vie appena descritte, la dopamina svolge un'importante funzione di modulazione tramite i recettori D_1 e D_2 , agisce da neurotrasmettitore stimolante sulla via diretta e inibitorio sulla via indiretta.

La neurodegenerazione dei neuroni dopaminergici porta a una riduzione dei livelli di dopamina che risulta meno efficiente nella regolazione del movimento, l'azione della via diretta viene ridotta, mentre aumenta l'azione della via indiretta.

Questo disequilibrio dei due circuiti modifica il rilascio degli altri neurotrasmettitori, come il glutammato che risulta in una aumentata fosforilazione dei recettori NMDA che diventano più sensibili al glutammato conducendo alle discinesie.

3. FARMACI ANTIPARKINSON

Il Parkinson è un disturbo generalmente idiopatico, anche se in alcuni casi l'eziologia è conosciuta, dovuto all'esposizione a una non ancora nota neurotossina o a reazioni ossidative. La malattia è caratterizzata da una riduzione della concentrazione di dopamina al livello dei gangli della base dovuta a una degenerazione dei neuroni dopaminergici della substantia nigra. Per questo motivo le terapie intraprese con farmaci agonisti dopaminergici riescono a dare buoni risultati nel controllo dei sintomi e nel garantire una migliore qualità di vita a questi pazienti, anche se non sono risolutivi della malattia.

Sono utilizzati anche farmaci antimuscarinici in quanto riescono a controllare il tremore e la rigidità tipici di questa patologia, ma hanno un effetto scarso sulla bradicinesia.

3.1 Levodopa

A tutt'oggi il farmaco più utilizzato e più efficace nel morbo di Parkinson è la (-)-3-(3,4-diidrossifenil)-L-alanina o levodopa (l-DOPA) in quanto precursore endogeno della dopamina. La dopamina di per sé non può essere utilizzata in quanto non riesce a superare la barriera ematoencefalica e quindi non arriva ai siti critici della patologia.

La levodopa riesce a penetrare tale barriera e a raggiungere quindi il sistema nervoso centrale dove viene poi decarbossilata, ad opera delle dopadecarbossilasi centrali, a dopamina. Una considerazione importante da fare a questo proposito è che la levodopa deve arrivare in quantità maggiore possibile al SNC, per questo è necessario inibire contemporaneamente le dopadecarbossilasi periferiche di modo da poter somministrare dosi inferiori del farmaco (circa il 75% in meno) con un migliore effetto terapeutico, un'emivita plasmatica prolungata e una riduzione degli effetti periferici.

La l-DOPA viene assorbita rapidamente dall'intestino tenue ed il suo assorbimento è legato alla velocità di svuotamento gastrico, al pH gastrico ed è ritardato dalla presenza di cibo. La sua emivita è di circa 1-3 ore, anche se bisogna tener conto delle differenze tra individui.

Il farmaco è più utile nelle prime fasi della malattia, in quanto successivamente la dose deve essere ridotta a causa dell'insorgenza di effetti collaterali indesiderati probabilmente legati a uno stato di ipersensibilità da denervazione selettiva o farmaco indotta.

Come detto sopra, la levodopa viene solitamente somministrata con un inibitore periferico delle dopadecarbossilasi come carbidopa e benserazide. Gli effetti indesiderati della l-DOPA sono nell'80% dei pazienti vomito, anoressia, nausea che possono essere risolti o attenuati con minori dosi di farmaco o con farmaci antiacidi e sono molto meno frequenti quando la levodopa è associata a un inibitore periferico delle dopadecarbossilasi. Il farmaco può inoltre causare ipertensione o ipotensione ortostatica e può causare aritmie dovute all'aumentata sintesi di catecolamine; può provocare dipendenze e disturbi comportamentali.

La discinesia è un effetto della l-DOPA che si manifesta in una grande percentuale dei pazienti e la sua eziologia è ancora motivo di studio e

ricerca in quanto non se ne conoscono con certezza i meccanismi che ne stanno alla base.

3.2 Agonisti dopaminergici

Gli agonisti dopaminergici sono farmaci che possono sommare il loro effetto terapeutico con quello della levodopa e agiscono direttamente sui recettori per la dopamina. Alcuni di essi sono specifici per determinati sottotipi recettoriali e quindi producono anche minori effetti collaterali.

3.2.1 Derivati della segale cornuta

I derivati della segale cornuta sono stati i primi agonisti dopaminergici utilizzati in terapia anti-Parkinson e tra questi troviamo la bromocriptina e la pergolide.

La bromocriptina è un agonista D_2 ed è utilizzato a dosi comprese tra i 7,5 e i 30 mg.

La pergolide, invece, è agonista sia a livello dei recettori D_1 che dei recettori D_2 ed è anche più attivo rispetto alla bromocriptina, ma lo sviluppo di malattie valvolari cardiache legate al suo impiego ha fatto sì che non venisse più utilizzato.

3.2.2 Agonisti non ergolinici della dopamina

Il pramipexolo è un agonista dopaminergico non ergolinico e ha una maggiore affinità per i recettori D_3 . Presenta un rapido assorbimento e permette di diminuire le dosi di levodopa somministrata garantendo comunque una buona efficacia nella terapia della patologia. Riesce a

distruggere il perossido di idrogeno e ad aumentare l'attività neurotrofica delle cellule dopaminergiche mesencefaliche in coltura, che ne fanno ipotizzare un effetto neuroprotettore.

Il ropinirolo è anch'esso un agonista dopaminergico non derivato dalla segale cornuta e mostra buona selettività per il recettore D₂. Se somministrato come monoterapia è efficace nella cura del Parkinson lieve.

A questa categoria di agonisti appartiene anche la rotigotina che sembra molto attiva se somministrata sottoforma di cerotto transdermico.

Gli effetti collaterali più frequenti degli agonisti dopaminergici sono nausea, vomito, stipsi, aritmie, cardiopatie valvolari (soprattutto con pergolide), discinesie e disturbi mentali.

3.3 Inibitori delle monoaminossidasi

Tali farmaci hanno come meccanismo d'azione quello di inibire gli enzimi responsabili del metabolismo della dopamina: le monoaminossidasi (MAO), nello specifico quelle di tipo B. A questa categoria appartiene la selegilina che è un inibitore irreversibile delle MAO B ed è utilizzato per rallentare e diminuire il catabolismo della dopamina di modo da aumentarne la persistenza nel vallo sinaptico e quindi potenziare l'effetto della levodopa.

Si presuppone un'attività neuroprotettiva del farmaco legata al suo metabolita, desmetilselegilina, che sembra ritardare il decorso della malattia.

Più potente della selegilina, come inibitore delle MAO B, troviamo la rasagilina che sembra allo stesso modo rallentare il decorso della malattia.

3.4 Inibitori della catecol-o-metil-transferasi

Le catecol-o-metil-transferasi (COMT) sono enzimi deputati al metabolismo delle catecolamine e quindi anche della levodopa che viene trasformata in 3-O-metildopa (3-OMD) conducendo a una minore risposta terapeutica al farmaco.

Il tolcapone e l'entacapone sono inibitori di questi enzimi e perciò aumentano la durata d'azione della levodopa permettendo di diminuirne il dosaggio in terapia combinata. L'entacapone ha effetti esclusivamente periferici mentre il tolcapone agisce anche a livello centrale, la loro emivita è di circa 2 ore.

I loro effetti indesiderati più comuni sono dovuti all'aumento della concentrazione plasmatica della levodopa e quindi a una conseguente amplificazione degli effetti collaterali di quest'ultima.

3.5 Altri farmaci

3.5.1 Apomorfina

L'apomorfina è un potente agonista dei recettori dopaminergici, per questo motivo è molto utilizzato nel trattamento del Parkinson sia come iniezioni sottocutanee sia come compresse orosolubili. Penetra molto velocemente la barriera emato-encefalica. È un farmaco fortemente emetico quindi per evitare tale complicazione si può associare a un antiemetico. Altri effetti indesiderati sono discinesie, sonnolenza, ipotensione e lividi al punto di iniezione.

3.5.2 Amantadina

L'amantadina è un farmaco antivirale che dal 1968 è utilizzato anche per il trattamento del Parkinson con una buona efficacia probabilmente dovuta a un potenziamento della sintesi e del rilascio di dopamina. La dose massima approvata è 400 mg al giorno per problemi di tolleranza. La sua emivita varia tra le 2 e le 4 ore. L'effetto dell'amantadina può esaurirsi dopo alcune settimane di trattamento. Può provocare diversi effetti collaterali che possono determinare l'interruzione della terapia come depressione, insonnia, allucinazioni, psicosi tossica acuta, convulsioni, alterazioni dermatologiche, edema periferico, insufficienza cardiaca, ipotensione posturale e disturbi gastrointestinali. Si può presentare anche la livido reticularis che regredisce con la sospensione del farmaco.

3.5.3 Farmaci anticolinergici

A questa categoria appartengono farmaci antimuscarinici come benztropina mesilato, biperidene, orfenadrina, prociclidina, triesilfenidile che hanno un buon controllo su tremore e rigidità tipici del morbo di Parkinson.

In condizioni normali i neuroni dopaminergici originanti dalla pars compacta della substantia nigra sono inibitori nei confronti delle efferenze GABAergiche striatali, mentre i neuroni colinergici sono eccitatori su tali efferenze.

Nella malattia di Parkinson, i neuroni dopaminergici degenerano e quindi viene meno il loro controllo inibitorio che non riesce più a compensare il controllo l'eccitatorio dei neuroni colinergici. Questo eccesso relativo di attività colinergica è responsabile del tremore e della rigidità.

I dosaggi iniziali di tali farmaci sono bassi e vengono gradualmente aumentati fino a raggiungere l'effetto terapeutico.

Gli effetti indesiderati sono dovuti a un eccessivo blocco del sistema parasimpatico (Aminoff, 2011).

4. FARMACOLOGIA DELLA DISCINESIA INDOTTA DA L-DOPA E RELATIVE STRATEGIE TERAPEUTICHE

Sebbene la l-DOPA sia il farmaco più efficace nella terapia del morbo di Parkinson, una ripetuta somministrazione di tale molecola conduce in molti casi a complicanze motorie come la discinesia che vanno ad aggravare il quadro clinico di questi pazienti.

Le discinesie indotte dalla l-DOPA (LID) sono movimenti involontari diversi dai tremori tipici del Parkinson che interferiscono con i movimenti volontari causando delle disabilità importanti.

I neuroni spinosi dello striato, privati della trasmissione dopaminergica a causa della deplezione di dopamina a livello della substantia nigra, diventano ipersensibili alla dopamina e quindi le variazioni dei livelli ematici di dopamina scatenano le discinesie nei pazienti con Morbo di Parkinson, dopo qualche anno dall'inizio del trattamento con la l-DOPA.

4.1 Tipi di discinesie

Le discinesie si sviluppano molto precocemente in pazienti parkinsoniani malati da circa una decina di anni e che non sono stati mai tratti con farmaci, proprio perché la denervazione è talmente elevata da innescare subito i movimenti discinetici.

Le discinesie possono essere di diversi tipi:

- di inizio dose;
- di picco dose, cioè nel momento in cui la dopamina raggiunge la concentrazione massima a livello sinaptico, presenta movimenti rapidi e continuativi, è il tipo di discinesia più frequente;

- di fine dose, cioè quando la concentrazione della dopamina cala, presenta movimenti distonici delle mani, del collo, delle braccia, delle gambe che durano nel tempo;
- bifasiche, meno comuni, presenti sia nel momento di picco dose sia quando la concentrazione si riduce. Sono principalmente influenzate le gambe con movimenti alterati stereotipati e si ha un'alterazione dell' andatura, questo tipo di discinesia si sviluppa prevalentemente nei pazienti maschi con Parkinson precoce e con precoci complicazioni motorie (Aquino and Fox, 2015).

Nella fase avanzata della malattia la comparsa delle discinesie è molto più frequente, in quanto si riduce la finestra terapeutica della l-DOPA e con l'aumentare della deplezione di dopamina si incorre in una stimolazione dei neuroni dopaminergici fasica, pulsatile, anziché tonica.

Terapie dopaminergiche continue possono quindi ridurre la comparsa delle discinesie.

4.2 Epidemiologia

In uno studio del 1996 si è osservato che il tempo di comparsa di questa complicanza nel 56% dei pazienti affetti da PD è di 2,9 anni dall'assunzione di l-dopa (Blanchet *et al.*, 1996), tale percentuale sale al 95% dopo 15 anni di terapia (Hely *et al.*, 2005). Il tempo medio stimato è di 6,6 anni (Evans *et al.*, 2011). Ogni anno il 10 % dei pazienti affetti da Parkinson sviluppano alterazioni motorie in seguito al trattamento con levodopa (Aquino and Fox, 2015).

4.3 Il sistema dopaminergico

4.3.1 Recettori dopaminergici

I recettori dopaminergici sono una classe di recettori metabotropici accoppiati a proteine G e si suddividono in 5 sottotipi, appartenenti a loro volta a due diverse famiglie recettoriali: la D₁-like family che comprende i recettori D₁ e D₅ che stimolano l'attività dell'adenilato ciclasi e la D₂-like family a cui appartengono i recettori D₂ (D_{2S} e D_{2L}), D₃ , D₄ (D_{4.2} , D_{4.4} , D_{4.7}) che riducono l'attività dell'adenilato ciclasi. I sottotipi recettoriali più studiati nella LID sono i D₁ e D₂ , in quanto sono i D₁ sono localizzati nella pars compacta della substantia nigra e i D₂ si trovano a livello post-sinaptico su neuroni striatali e a livello pre-sinaptico su assoni della substantia nigra di neuroni dei gangli della base; questi due sottotipi sono quindi i più espressi a livello del corpo striato e di fatti si è ipotizzato che possano essere alla base dell'insorgenza della discinesia.

La l-DOPA induce discinesia tramite un'eccessiva inibizione delle proiezioni neuronali putamen-GPe della via indiretta (D₂ mediata) e una conseguente disinibizione del GPe che si riflette in una inibizione del STN conducendo a un ridotto input eccitatorio del STN e a un'ipoattività dei sistemi di output GPi/SNr. La via diretta D₁ mediata è al contrario sovra-stimolata. L'effetto di questi disequilibri sarebbe, quindi, una ridotta inibizione dei neuroni talamo-corticali con conseguente sovra-eccitazione delle aree della corteccia motoria (Sharma *et al.*, 2015). Un meccanismo compensatorio di internalizzazione dei recettori D₁ potrebbe di conseguenza alleviare i movimenti involontari indotti dalla somministrazione di l-DOPA. I recettori D₁ sembrano anche coinvolti nei meccanismi di priming della LID per questo sono i più studiati, ma una volta che il priming si è verificato l'attenzione viene rivolta sia sui recettori

D₁ sia sui recettori D₂ poiché se stimolati, entrambi possono condurre all'insorgenza della LID che sarà più grave se la stimolazione avviene simultaneamente su entrambi i sottotipi recettoriali o meno grave se selettiva su uno dei due recettori. Per studiare i meccanismi alla base della LID quindi è importante tenere conto sia della durata dell'effetto agonista di l-DOPA su tali recettori, sia della selettività dei farmaci nei confronti dei due recettori.

Uno studio preclinico condotto nel 2013 dall'università del Tennessee e dalla Southern Medical University di Guangzhou, Cina (Li and Zhou, 2013) dimostra che una consistente perdita di dopamina a livello dello striato dorsale pone le basi per il verificarsi della LID come conseguenza del trattamento con l-DOPA o con un farmaco D₁ agonista e che sussiste uno stretto parallelismo tra i meccanismi farmacologici che stimolano i movimenti normali e quelli discinetici. A tale scopo sono stati utilizzati topi privati della funzione del gene *Pitx3*, tale privazione conduce alla morte della maggior parte dei neuroni dopaminergici striatali e quindi a una forte risposta in seguito al trattamento con l-DOPA.

In riferimento a studi condotti su scimmie lesionate con MPTP (la MPTP o 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine è una protossina in grado di sviluppare forme gravi di parkinsonismo a causa del suo metabolita MPP⁺ che una volta captato dalle cellule della substantia nigra inibisce la fosforilazione ossidativa portando a morte cellulare e deplezione della dopamina striatale) e su ratti lesionati con 6-OHDA (la 6-OHDA o 6-hydroxydopamine è una neurotossina che viene captata dai sistemi di reuptake delle catecolamine e riesce pertanto a entrare nei neuroni dopaminergici distruggendoli) mai trattati con il farmaco precedentemente, risulta abbastanza chiaro che, negli stati discinetici, la distribuzione dei recettori D₁ sia alterata (Huot *et al.*, 2013a; Huot *et al.*, 2013b). È stato riportato (Sharma *et al.*, 2015) che i pazienti affetti dal morbo di Parkinson

mostrano livelli maggiori di G α olf (olfactory type G α _s subunit) che incrementano la produzione dopamino-mediata di AMP ciclico e conseguente attivazione della proteina chinasi A (PKA). La PKA attivata nello striato in seguito alla stimolazione dei recettori D₁ causa fosforilazione della DARPP-32 (fosfoproteina di 32 kDa regolata dal cAMP e dalla dopamina) sul residuo Thr-34 portando a un'inibizione della proteina fosfato PP-1, la quale amplifica il segnale del cAMP.

Nel descrivere i possibili meccanismi alla base della LID bisogna tener conto anche della plasticità sinaptica, ovvero la capacità del sistema nervoso di modulare l'intensità delle sinapsi. Questa capacità risulta alterata in caso di discinesia indotta da l-DOPA a causa delle alterazioni delle vie coinvolte nella regolazione dell'espressione genica come ad esempio la via ERK (extracellular regulated kinase) che risulta sovraeccitata nella LID e porta a sovraespressione di proteine quali MSK1 (miogen and stress activated kinase 1), CREB (cAMP response element-binding protein) e mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1). Nella LID è stato anche riportato un aumento delle proteine Δ FosB e Zif268 (Sharma *et al.*, 2015) che hanno un importante ruolo nella plasticità neuronale.

Per quanto riguarda il recettore D₃, la sua stimolazione potrebbe condurre a una stimolazione del recettore D₁ e quindi a una sovra-eccitazione della via diretta che sembra essere un punto critico nell'insorgenza della LID; per questo motivo si potrebbe pensare a un antagonismo del recettore D₃ come possibile terapia preventiva del priming della LID.

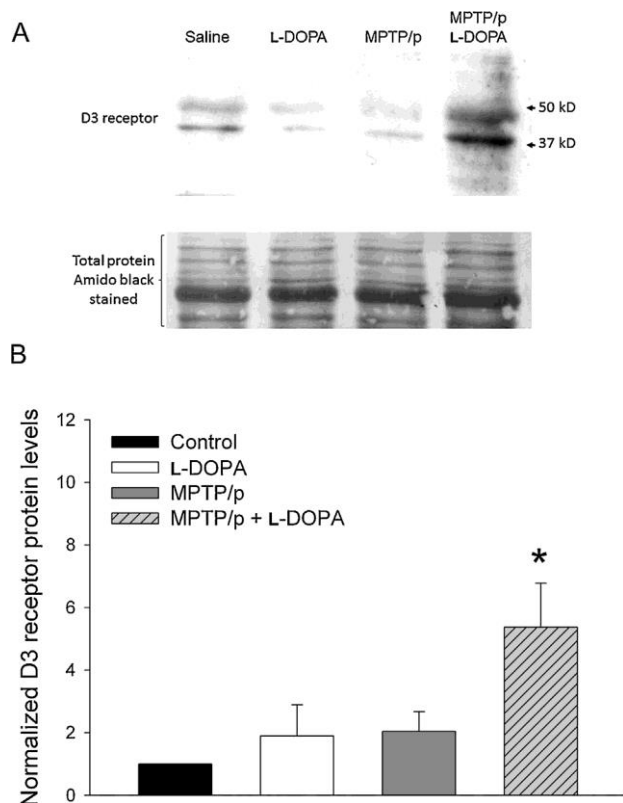


Figura 2. Livelli dei recettori D3 analizzati con il Western Blot. Si nota che solo il gruppo trattato con MPTP/p + l-DOPA mostra livelli recettoriali aumentati in modo significativo.

Fonte: Cote, S.R., Kuzhikandathil, E.V., 2015. Chronic levodopa treatment alters expression and function of dopamine D3 receptor in the MPTP/p mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 585, 33-37.

In uno studio recente (Cote and Kuzhikandathil, 2015) è stata testata l'ipotesi che un trattamento cronico con l-DOPA alteri la funzione e l'espressione dei recettori D₃ in modelli parkinsoniani di ratti lesionati con MPTP/p (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine plus probenecid) allo scopo di indurre deficit motori. I ratti

(n=48) sono stati suddivisi in 4 gruppi (12 ratti per gruppo): il controllo ha ricevuto iniezioni di soluzione

fisiologica per 5 settimane, il gruppo "l-DOPA" ha ricevuto iniezioni di soluzione fisiologica bisettimanali per 5 settimane con l'aggiunta di l-DOPA due volte al giorno nelle ultime due settimane, il gruppo "MPTP/p" è stato trattato con iniezioni bisettimanali di MPTP + probenecid (25 mg/kg e 250 mg/kg rispettivamente) per un periodo di 5 settimane più somministrazioni di soluzione fisiologica due volte al giorno nelle ultime due settimane e il gruppo "MPTP/p + l-DOPA" ha ricevuto iniezioni bisettimanali di MPTP/p più l-DOPA due volte al giorno nelle ultime due settimane. I dosaggi di MPTP + probenecid erano di 25 mg/kg e 250 mg/kg rispettivamente e quelli di l-DOPA di 25 mg/kg. L'espressione recettoriale di D₃ è stata misurata tramite la tecnica del western blot e la sua funzione di

trasduzione del segnale è stata valutata misurando l'attivazione della via MAPK D₃ mediata.

I livelli del recettore D₃ sono stati standardizzati in relazione alle proteine totali caricate in ogni striscia e rivelate con la tecnica dell'amido black stain.

I livelli recettoriali sono notevolmente aumentati soltanto nel gruppo trattato con MPTP/p + l-DOPA (**Figura 2.**)

Per determinare la funzione di trasduzione del segnale dei recettori D₃ è stato somministrato un agonista selettivo di tale recettore, PD128907 (0,05 mg/kg), in ognuno dei quattro gruppi in studio e sono state misurate le modifiche dei livelli di pERK nella parte dorsale dello striato: tali livelli sono aumentati soltanto nel gruppo di controllo, indicando un fallimento dei recettori D₃ di attivare il signaling MAPK. I livelli di pERK sono invece statisticamente diminuiti nel gruppo trattato con MPTP/p.

Ciò dimostra quindi che una lesione indotta da MPTP e un successivo trattamento cronico con l-DOPA causano un'alterazione nell'espressione recettoriale di D₃ e una perdita di funzionalità di tale recettore che non è più in grado di attivare la via di traduzione del segnale MAPK.

In uno studio precedente (Liu *et al.*, 2009) era stato mostrato che la deplezione di dopamina in un modello di ratto parkinsoniano, aumenta la fosforilazione della calmodulina calcio-dipendente che quindi porta a una downregulation della funzione del recettore D₃ e potrebbe quindi spiegare la perdita di funzionalità di questi recettori. Questa perdita di funzionalità potrebbe contribuire all'alterazione del rilascio di dopamina e glutammato e quindi all'insorgenza della discinesia indotta da l-DOPA.

4.3.2. Deplezione della dopamina striatale

La deplezione della dopamina a livello striatale sembra essere un fattore molto importante nella LID, in quanto, anche se può non esserne la diretta causa, potrebbe creare un terreno fertile per l'instaurarsi e lo svilupparsi di questa complicanza in modo più rapido e più intenso (Huot *et al.*, 2013a). Di fatti la discinesia è di maggiore entità quando il morbo è in fase avanzata e vi è quindi una perdita molto elevata di dopamina.

In scimmie sane e soggetti umani non parkinsoniani ma con disturbi neuropsichiatrici che influenzano il sistema nervoso centrale, la discinesia è stata stimolata con alte dosi di l-DOPA (1200 mg al giorno), mentre nei soggetti affetti dalla malattia di Huntington presintomatica, la dose di l-DOPA sufficiente per suscitare la discinesia è di 500 mg (Huot, 2015). Nei soggetti umani sani, invece, la situazione è molto meno chiara in quanto gli studi sono pochi e la durata dei trattamenti è limitata a poche settimane con basse dosi che quindi potrebbe essere troppo corta per poter sviluppare discinesie. Essendo tali soggetti sani, non sarebbe etico prolungare tale trattamento o aumentare le dosi di l-DOPA, quindi probabilmente questi trials non saranno mai utilizzati per predire la dose di farmaco e il tempo di trattamento necessari per l'insorgenza della LID. Questi studi però ribadiscono che, anche se la deplezione di dopamina a livello striatale può non essere la causa scatenante di tale effetto, può invece facilitare l'insorgenza di questi movimenti involontari che si verificherebbero a dosi di l-DOPA minori e dopo una durata di trattamento più breve (Huot, 2015).

4.3.3 Rilascio pulsatile di dopamina

In condizioni normali il rilascio di dopamina è sia tonico che fasico di modo che i livelli del neurotrasmettitore non scendano mai al di sotto di un certo valore, quando però siamo nella condizione di Morbo di Parkinson ,

tale rilascio si altera e prende il sopravvento la componente fasica, mentre quella tonica che garantiva livelli costanti e strettamente regolati di dopamina va lentamente scomparendo, fino a diventare nulla nelle fasi più avanzate della malattia. Nelle prime fasi del Parkinson, le terminazioni dopaminergiche residue possono compensare la mancanza di rilascio tonico di dopamina, mentre nelle fasi più gravi il rilascio diventa irreparabilmente pulsatile poiché esclusivamente conseguente alla somministrazione di l-DOPA.

Sembra quindi che l'emivita di tale farmaco giochi un ruolo molto importante nello sviluppo delle discinesie e che una stimolazione continua dei recettori dopaminergici potrebbe evitare questa complicanza (Huot *et al.*, 2013a)

Gli agonisti dopaminergici hanno emivita più lunga della l-DOPA e la loro somministrazione produce una stimolazione continua dei recettori dopaminergici che quindi ritarderebbe l'instaurarsi della LID, bisogna però fare una distinzione fra tali molecole, in quanto gli agonisti dei recettori D₂ e D₃ sembrano suscitare discinesie meno gravi rispetto a quelle derivanti da l-DOPA e dagli agonisti D₁. Ancora una volta si vede quindi come i recettori D₁ siano un punto critico nel processo di priming della LID e nel suo sviluppo.

Le strategie per ridurre la stimolazione pulsatile dei recettori dopaminergici e quindi la discinesia potrebbero essere quelle di somministrare un agonista D₁ selettivo e a lunga durata d'azione oppure di intervenire andando a aumentare la durata d'azione della l-DOPA inibendone la sua catabolizzazione ad opera delle COMT.

In uno studio in cui è stato aggiunto ropinirolo a rilascio prolungato alla l-DOPA si è visto che ciò ha condotto a una riduzione della discinesia (Watts *et al.*, 2010), mentre se si somministra soltanto l-DOPA a rilascio prolungato la gravità della discinesia non si riduce; quindi una possibile

spiegazione potrebbe essere che la riduzione della LID ottenuta con il ropinirolo è legata prevalentemente al fatto che questo farmaco stimola in modo preferenziale i recettori D₂ e D₃ e in modo minore alla sua lunga durata d'azione (Huot *et al.*, 2013a).

Si potrebbe quindi pensare di utilizzare farmaci agonisti dei recettori dopaminergici a lunga durata d'azione per assicurare un rilascio costante di dopamina e di conseguenza un ritardo nell'insorgenza della discinesia, il problema è rappresentato dal fatto che tali farmaci non mostrano la stessa efficacia della l-DOPA nella terapia sintomatica della patologia e quindi i pazienti ne trarrebbero un giovamento minore e insoddisfacente. La l-DOPA migliora notevolmente la qualità di vita di queste persone e in fase avanzata della malattia è impensabile una monoterapia con agonisti dopaminergici. Per questo motivo è ancora più difficile trovare una soluzione all'instaurarsi della LID poiché dovendo necessariamente utilizzare la l-DOPA, non esistono per ora forme farmaceutiche in grado di rilasciare il farmaco durante l'intera giornata e le iniezioni endovenose sono troppo invasive e non convenienti dato che i sintomi della malattia nelle prime fasi del Parkinson sono bene controllati da due o tre somministrazioni giornaliere di farmaci dopaminergici.

4.4 Il sistema glutammatergico

Il glutammato è un aminoacido che funziona come neurotrasmettitore eccitatorio principale nel cervello. Si ritiene che una iperattività delle vie eccitatorie glutammatergiche possa notevolmente contribuire allo sviluppo e alla gravità della LID in quanto tale neurotrasmettitore va a sovra-stimolare la corteccia e quindi la via diretta che si è visto essere iperattiva nelle discinesie indotte da l-DOPA. I recettori glutammatergici sono quindi una possibile strategia terapeutica per la LID.

Il glutammato attiva recettori ionotropici e metabotropici.

4.4.1 Recettori ionotropici NMDA

I recettori NMDA (N-methyl- D-aspartate) sono dei tetrameri composti da almeno una subunità N1 e una N2 e che possono presentare anche una subunità N3. Nelle discinesie indotte da L-DOPA si è riscontrata una alterazione dei livelli recettoriali, riguardante principalmente le subunità recettoriali NR2A , NR2B e NR1.

La stimolazione dei recettori D₁ ha un forte impatto sulla distribuzione recettoriale delle subunità recettoriali suddette, infatti “ nello striato di un ratto discinetico lesionato con 6-OHDA si è riscontrata una ridistribuzione di NR2B dai siti sinaptici ai siti extrasinaptici nelle membrane plasmatiche e il numero di NR2A post-sinaptici era aumentato” (Huot *et al.*, 2013a). Le subunità NR2A sembrano subire up-regulation nello striato anche se non è ancora chiaro se questo aumento recettoriale avvenga lungo la via diretta o lungo la via indiretta; una riduzione di tale livelli potrebbe rappresentare una valida strategia per sopprimere la LID. Analizzando, post mortem, animali lesionati con MPTP si vede che l’antagonismo del recettore NR2B può migliorare la discinesia, mentre il blocco del NR1 ne può prevenire il processo di priming.

L’effetto di miglioramento della LID esercitato dal farmaco amantadina potrebbe essere legato a un suo antagonismo non selettivo dei recettori NMDA, tale effetto è importante poiché sembra non influenzare l’attività terapeutica antiparkinsoniana.

In un trial clinico pubblicato nel 2015 (Pahwa *et al.*, 2015), è stata studiata una forma di amantadina a rilascio prolungato per il trattamento della LID. La ADS -5102 è una capsula a rilascio prolungato di amantadina cloridrato da assumere una volta al giorno prima di coricarsi, in quanto la dose massima interna si raggiunge dopo 12-14 ore dalla somministrazione e quindi permette di garantire concentrazioni plasmatiche di farmaco elevate durante l'intera mattina che diminuiscono la sera per ridurre gli effetti collaterali notturni. Per questo studio a doppio cieco sono stati arruolati 83 pazienti affetti da morbo di Parkinson di età compresa tra i 30 e gli 85 anni. Sono rimasti immutati i trattamenti farmacologici che i pazienti avevano intrapreso e l'assunzione di levodopa doveva essere di almeno tre volte al

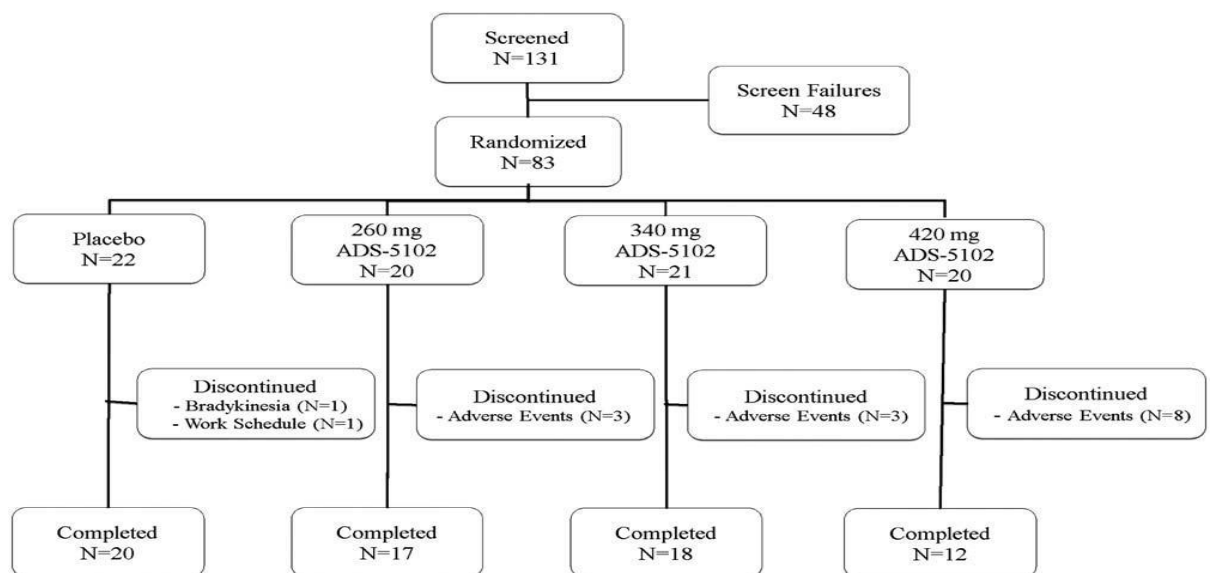


Figura 3. Schema riassuntivo del trattamento.

Fonte: Pahwa, R., Tanner, C.M., Hauser, R.A., Sethi, K., Isaacson, S., Truong, D., Struck, L., Ruby, A.E., McClure, N.L., Went, G.T., Stempien, M.J., 2015. Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED Study). *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*.

giorno.

Il primo giorno, i pazienti idonei sono stati suddivisi in modo casuale in quattro gruppi differenti: uno riceveva il placebo, uno 260 mg di ADS-5102, uno 340 mg di ADS-5102 e uno 420 mg di ADS-5102 (**Figura 3.**). Le capsule erano tutte apparentemente identiche, i gruppi che ricevevano il

placebo e 260 mg di ADS-5102 sono stati trattati con queste due metodiche per 8 settimane, mentre gli altri due gruppi hanno ricevuto tutti 260 mg di ADS-5102 nella prima settimana e 340 mg di ADS-5102 nella seconda settimana, poi uno dei due gruppi ha ricevuto 420 mg di ADS-5102 a partire dalla terza settimana.

Le valutazioni sono state fatte dopo le settimane 1,2,4,6 e 8 e lo studio è stato seguito da un periodo di follow-up di 14 giorni. I pazienti hanno avuto come compito quello di completare un diario riguardo alla LID per 2 giorni consecutivi prima dell'inizio dello studio (che serviva come baseline) e anche prima delle settimane 2,4,6 e 8. I campioni di amantadina plasmatica sono stati prelevati il primo giorno, nelle settimane 1,2,4,6 e 8 tra le 9 del mattino e le 4 del pomeriggio, ovvero nel momento in cui la concentrazione era rappresentata da un plateau. Le misurazioni sono state fatte tenendo conto delle scale UDysRS (Unified Dyskinesia Rating Scale) (**Figura 4.**), FSS (Fatigue Severity Scale), MDS-UPDRS (Unified Parkinson's Disease Rating Scale approvata dalla Movement Disorder Society) e CGI-C (Clinician's Global Impression of Change).

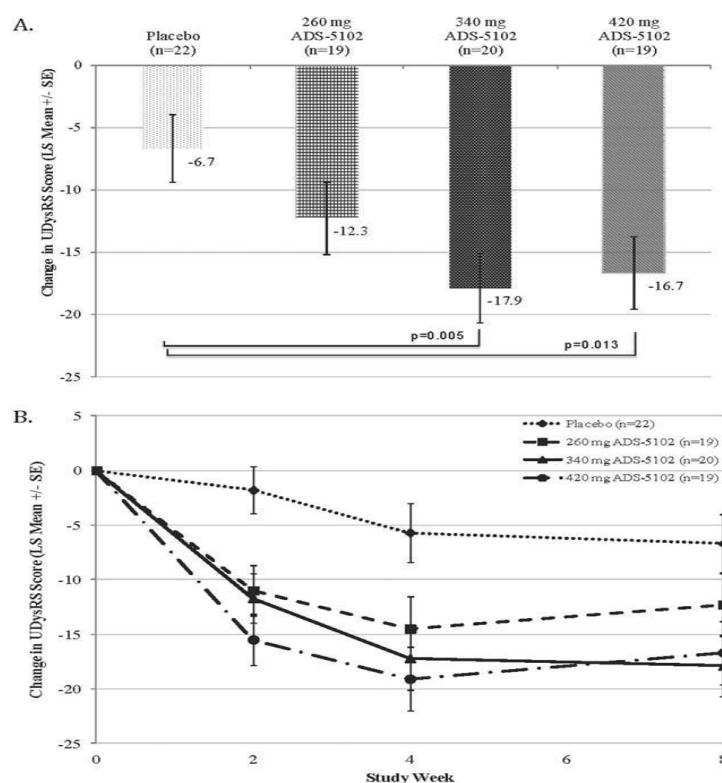


Figura 4. Effetti di placebo e ADS-5102 (260 mg, 340 mg, 420 mg) sui punteggi della scala UDysRS.

Fonte: Pahwa, R., Tanner, C.M., Hauser, R.A., Sethi, K., Isaacson, S., Truong, D., Struck, L., Ruby, A.E., McClure, N.L., Went, G.T., Stempien, M.J., 2015. Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED Study). Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society.

L'81% dei pazienti ha completato lo studio, il restante 19% ha abbandonato o ha assunto il farmaco in modo discontinuo a causa degli effetti indesiderati. Il gruppo che riceveva 340 mg di ADS-5102 ha riscontrato una significativa riduzione della LID con un miglioramento del 27% rispetto al gruppo placebo. Il gruppo di 340 mg di ADS-5102 ha avuto un miglioramento del 43% rispetto al baseline e il gruppo placebo del 16% rispetto al baseline. Il gruppo che riceveva 420 mg di ADS-5102 ha mostrato un miglioramento del 25% rispetto al placebo, mentre il gruppo trattato con 260 mg di ADS-5102 non ha evidenziato un miglioramento rilevante rispetto al placebo. All'aumentare delle concentrazioni di ADS-5102 aumentavano anche le reazioni avverse; le più frequenti erano allucinazioni principalmente visive, alterazioni polmonari e mentali, iperattività cutanea, disordini psicotici, infezioni urinarie, ematomi subdurali, costipazione, vertigini, cefalee.

Si può quindi concludere che 340 mg di ADS-5102 somministrati una volta al giorno al momento di coricarsi sono ben tollerati e migliorano notevolmente la LID nei soggetti parkinsoniani, come riscontrato anche dalla scala UDysRS e dai diari personali, si ha un buon rapporto rischio/beneficio a questo dosaggio. Anche la dose più elevata di ADS-5102, 420 mg, aveva un buon effetto sulla LID ma presentava una frequenza e entità maggiore di effetti indesiderati. La scala MDS-UPDRS non ha registrato peggioramento dei sintomi del Parkinson con l'utilizzo di ADS-5102.

Il rilascio prolungato ha garantito una buona tollerabilità del farmaco durante la giornata e una minore comparsa degli effetti avversi notturni.

Uno studio preclinico dell'Università di Shanghai (Teng *et al.*, 2014) pubblicato sul Neural Regeneration Research si è posto l'obiettivo di esaminare gli effetti della formula composta della *Rehmannia* nell'espressione dei geni correlati agli aminoacidi con funzione di

neurotrasmettitore nel corpo striato di ratti parkinsoniani con discinesia indotta da levodopa. I rimedi tradizionali cinesi sembrano alleviare i sintomi del Parkinson e della LID. Poiché nella LID si ritrovano livelli di aminoacidi eccitatori (aspartato e glutammato) aumentati nello striato, l'efficacia della Rehmannia si ipotizza essere dovuta alla riduzione di tali livelli. Gli animali utilizzati per l'esperimento sono 200 ratti sani adulti del tipo Sprague-Dawley. 16 ratti sono stati utilizzati come gruppo di controllo, altri 16 hanno ricevuto iniezioni di soluzione salina contenente 0,2 % di acido ascorbico nella substantia nigra sinistra come placebo, i restanti 168 ratti sono stati lesionati con 6-OHDA nella substantia nigra sinistra. Di questi 168, 50 mostravano sintomi di Parkinson mentre 118 non mostravano nessun sintomo. I 50 ratti hanno ricevuto quindi, dopo 7 giorni, un'iniezione intraperitoneale di l-DOPA + benserazide per provocare la LID. 32 ratti di questi 50, mostravano le caratteristiche della LID e sono stati divisi in due distinti gruppi: uno di controllo che riceveva una soluzione di acqua, etanolo e acido ascorbico e un altro gruppo che riceveva la formula composta della Rehmannia. Tale formula conteneva: 15 g di Rehmannia, 30 g di radice di Peonia erbacea, 15 g di Ramuli umcariae cum uncis, 15 g di Madreperla, 20 g di radice di Salvia Miltiorrhiza, 12 g di Acorus Tatarinowii, 2 g di Scorpion e 6 g di foglie del Tè Verde; il tutto è stato bollito in un decotto alla concentrazione di 5,18 g/ml.

L'analisi finale è stata effettuata su 64 ratti e ha dato i seguenti risultati:

- riduzione dei movimenti involontari, valutati secondo il punteggio AIMs (Abnormal involuntary movement scores) nel gruppo che ha ricevuto la Rehmannia e riduzione delle rotazioni;
- dopo trattamento con la formula composta della Rehmannia, i livelli di mRNA (valutati con PCR) dei recettori NMDA diminuiscono, sebbene rimangono sempre alti rispetto al gruppo di controllo mentre

i livelli di mRNA dei recettori B per il GABA aumentano, rimanendo comunque più bassi rispetto al controllo.

In conclusione, la somministrazione della formula composta della *Rehmannia* andrebbe a ristabilire un equilibrio tra aminoacidi inibitori e eccitatori che se sbilanciato può essere un fattore determinante della LID. Lo studio dimostra inoltre che, nello striato dei ratti discinetici, si ha un forte aumento di glutammato, supportando la teoria che un aumento della funzione dei recettori per il glutammato sia un meccanismo alla base della LID.

4.4.2 Recettori ionotropici AMPA

Un altro tipo di recettori ionotropici per il glutammato sono gli AMPA (alfa-Amino-3-Idrossi-5-Metil-4-isoxazolone propinato): doppi dimeri contenenti una subunità GluR2 e una subunità GluR1, GluR2, GluR3 o GluR4. Nel caso in cui non ci sia la subunità GluR2 il recettore è permeabile agli ioni calcio. Da vari studi post mortem è stato dimostrato che i livelli delle subunità GluR2 e GluR3 risultano alterati nella LID, nello specifico sono aumentati nella membrana sinaptica dello striato in ratti lesionati con MPTP, così come sembra aumentata la fosforilazione delle subunità GluR1.

Gli studi farmacologici suggeriscono anch'essi una potenziale attività antidiscinetica di molecole antagoniste dei recettori AMPA. Tali studi però non si sono concentrati sulla selettività delle molecole per determinati sottotipi recettoriali e quindi non forniscono informazioni sulla correlazione tra attività antidiscinetica e selettività recettoriale.

L'effetto degli AMPA antagonisti è stato studiato in un trial preclinico (Kobylecki *et al.*, 2010) che ha valutato gli effetti comportamentali e molecolari di un blocco acuto e cronico della permeabilità al calcio dei recettori AMPA in modelli animali di Parkinson. A tale scopo sono stati

utilizzati ratti maschi della specie Sprague-Dawley lesionati con la neurotossina 6-OHDA e scimmie lesionate con MPTP.

La molecola antagonista dei recettori AMPA utilizzata è IEM 1460(1-trimethylammonio - 5 - (1-adamantane-methylammoniopentane) dibromide dydrobromide).

I ratti lesionati con 6-OHDA hanno ricevuto per 21 giorni, dopo 5 settimane dalla lesione, l-DOPA e benserazide per provocare la discinesia e, successivamente, hanno ricevuto l-DOPA e benserazide due volte a settimana per mantenere stabili i movimenti involontari. Gli animali con un punteggio AIM maggiore o uguale a 10 sono stati ritenuti idonei per gli studi comportamentali e hanno ricevuto IEM 1460 o veicolo + l-DOPA/benserazide, è stata così valutata l'efficacia in acuto del farmaco. In un secondo esperimento, i ratti sono stati suddivisi in tre gruppi così trattati per 21 giorni: un gruppo (n=7) riceveva il veicolo, un altro gruppo (n=6) riceveva l-DOPA/benserazide + veicolo e il terzo gruppo (n=7) riceveva l-DOPA/benserazide + IEM 1460. I movimenti involontari (AIMs) sono stati valutati nei giorni 1,7,14,21 , mentre i comportamenti rotazionali nei giorni 2,8,15,20.

Le scimmie, lesionate con MPTP e con LID indotta da trattamento continuato per 3 settimane con l-DOPA e benserazide, hanno ricevuto due volte a settimana l-DOPA per mantenere stabile la discinesia e, in combinazione con essa, dosi acute di IEM 1460.

Per quanto riguarda i ratti, si è osservata una riduzione del 62% dei movimenti involontari nel gruppo trattato con IEM 1460 3mg/kg, rispetto al veicolo e il trattamento cronico con il farmaco ha condotto a una riduzione degli effetti comportamentali e molecolari della LID. Gli esperimenti sulle scimmie hanno confermato un effetto dose-dipendente dell' antagonista dei recettori AMPA che mostra efficacia maggiore a dose più elevata. Questi risultati indicano quindi un coinvolgimento della

permeabilità al calcio dei recettori AMPA nello sviluppo della LID, una volta avvenuto il priming. Il sito d'azione principale sembra essere lo striato. Viene suggerito inoltre che il blocco della permeabilità al calcio dei recettori AMPA possa attenuare l'elevato signaling delle vie ERK tipico della LID e quindi avere effetto anche sulla plasticità sinaptica. Anche l'espressione della proencefalina A e B, che nella LID è aumentata, risulta attenuata dalla co-somministrazione di l-DOPA e IEM 1460.

La molecola IEM 1460 non mostra effetti avversi sull'attività antiparkinsoniana e quindi potrebbe essere una buona strategia terapeutica per la LID.

È stata anche valutata l'influenza di alterazioni dello splicing alternativo delle subunità recettoriali GluR1 e GluR2 nello striato in modelli di ratti parkinsoniani lesionati con 6-OHDA (Kobylecki *et al.*, 2013). I recettori AMPA possono presentarsi come isoforma Flip, sempre presente nei neuroni, o isoforma Flop, presente negli stadi tardivi dello sviluppo.

Nell'esperimento 1 è stato osservato lo splicing alternativo delle due subunità recettoriali in fase acuta di LID, in ratti lesionati con 6-OHDA e trattati per 21 giorni, a partire dalla 5 settimana successiva alla lesione, con l-DOPA/benserazide o veicolo

Nell'esperimento 2 è stata osservata l'influenza dello splicing alternativo nel processo di priming della LID e i ratti lesionati con 6-OHDA sono stati trattati per 21 giorni, dopo cinque settimane dalla lesione, con l-DOPA/benserazide, veicolo o l-DOPA + IEM 1460.

L'mRNA dell'isoforma Flip del GluR2 risulta aumentato nello striato laterale del ratto discinetico, mentre non si rileva nessuna alterazione riguardo all'isoforma Flop. L'isoforma Flip del GluR1 e del GluR2 è aumentata nello striato di ratti che hanno già subito il processo di priming della discinesia e un farmaco che blocca la permeabilità al calcio dei recettori AMPA (IEM 1460) risulta efficace nella riduzione

dell'espressione di tali isoforme. Quindi lo splicing alternativo contribuisce allo sviluppo della LID provocando una up-regulation della funzionalità dei recettori AMPA striatali.

Clinicamente è stata recentemente osservata l'azione del farmaco anticonvulsivante topiramato sulla discinesia indotta da l-DOPA, poiché sembra che agisca a livello dei recettori AMPA riducendo la fosforilazione delle subunità GluR1 (Kobylecki *et al.*, 2014). Come detto prima, il blocco di recettori AMPA permeabili al calcio contenenti GluR1 può essere una strategia per combattere la LID. Questo studio clinico, a doppio cieco, ha reclutato inizialmente 15 pazienti affetti da Morbo di Parkinson e con LID stabile che sono stati suddivisi in gruppi e trattati con topiramato o placebo. I pazienti idonei sono stati suddivisi in due gruppi random che ricevevano capsule di 25 mg di topiramato o placebo, 10 di questi pazienti erano in cura anche con amantadina. I pazienti hanno ricevuto 100 mg di topiramato al giorno (4 capsule al dì) per 4 settimane, con una successiva fase di mantenimento di due settimane.

Gli strumenti di misura dei risultati sono stati: AUC (area under the curve) della gravità della LID, scala UPDRS III e IV, scala LFADLDS (Lang-Fahn Activities of Daily Living Dysinesia Scale), scala PGI (patient global impression of change) e scala GDS-15 (Geriatric Depression Scale).

Lo studio è stato completato da un totale di sette pazienti. Cinque pazienti trattati con topiramato e uno trattato con il placebo hanno abbandonato lo studio a causa di reazioni avverse che si sono riscontrate in nove pazienti ricevanti il farmaco e in quattro ricevanti il placebo. Le reazioni avverse più comuni sono state: problemi respiratori, ansietà, depressione, secchezza degli occhi e della bocca, allucinazioni e peggioramento della discinesia.

La AUC della gravità della LID era maggiore nei pazienti trattati con topiramato rispetto che quelli ricevanti il placebo, le scale PGI e UPDRS

IV non hanno mostrato differenze tra farmaco e placebo , così come la scale GDS-15 e LFADLDS.

Il risultato di tale studio è stato che il farmaco topiramato non è ben tollerato dai pazienti in quanto provoca debilitanti effetti collaterali e inoltre sembra peggiorare il quadro clinico della discinesia anziché migliorarlo.

Un limite di questo trial potrebbe essere stato quello di possibili interazioni tra amantadina e topiramato anche se i pazienti trattati con solo topiramato hanno comunque mostrato un peggioramento della discinesia.

4.4.3 Recettori ionotropici del Kainato

Per quanto riguarda questi recettori, l'efficacia di molecole che li antagonizzano sulla terapia della LID non è ancora chiara.

4.4.4 Recettori metabotropici per il glutammato

I recettori metabotropici per il glutammato sono recettori accoppiati a proteine G formati da 7 domini transmembranari e sono indicati con la sigla mGlu. Ne esistono 8 tipi diversi suddivisi in 3 gruppi: gruppo I (mGlu1 e mGlu5), gruppo II (mGlu2 e mGlu3) e gruppo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7 e mGlu8).

I livelli dei recettori del gruppo II sembrano essere alterati in caso di discinesia indotta da l-DOPA, ma non è ancora stabilito il loro ruolo nella LID.

Per quanto riguarda i recettori mGlu5, essi sono abbondantemente presenti nello striato e sono correlati ai recettori NMDA da un feedback positivo, quindi antagonizzare gli mGlu5 potrebbe diminuire la sovra-stimolazione

degli NMDA presente nella LID. Gli mGlu5 sono anche connessi ai recettori D₁ e D₂, aumentando il loro signaling a valle.

Sono stati effettuati vari trials preclinici per valutare l'efficacia di molecole antagoniste degli mGlu5 nel trattamento della LID.

“Effetti antidiscinetici di antagonisti del recettore mGlu5 (MPEP, MTEP, fenobam o MRZ-8676) sono stati riscontrati in ratti discinetici lesionati con 6-OHDA. Studi su scimmie lesionate con MPTP hanno riportato effetti antidiscinetici di MPEP, MTEP, fenobam e mavoglurant (AFQ056)” (Rascol *et al.*, 2014)

Un trial preclinico recente (Ko *et al.*, 2014) ha valutato l'efficacia di un'associazione tra fenobam e amantadina per il trattamento della discinesia indotta da l-dopa su modelli animali di Parkinson. Lo studio è stato effettuato su macachi lesionati con MPTP e l'effetto antidiscinetico è stato valutato dopo la somministrazione di fenobam (10-30 mg/kg) e amantadina (10-30 mg/kg) da soli o in associazione.

I risultati sono stati confrontati con il gruppo di controllo che ha ricevuto solo il veicolo. Se somministrati da soli, i due farmaci, producono un effetto antidiscinetico solo a alte dosi (30 mg/kg), se somministrati in associazione, invece si ha l'effetto a dosi minori (10-20 mg/kg) e quindi anche minore insorgenza di effetti indesiderati. Il fenobam da solo ad alte dosi ha una buona efficacia nel ridurre la LID in quanto è un antagonista dei recettori mGlu5 e probabilmente parte di questo effetto è dovuto anche alla sua capacità di bloccare i recettori per l'adenosina A₃.

La combinazione dei due farmaci non peggiora il quadro clinico del Parkinson, ma anzi migliora quello della LID, suggerendo una possibile strategia terapeutica.

È stato dimostrato (Jaeschke *et al.*, 2015) che i modulatori allosterici negativi NAMs dei recettori per il glutammato mGlu5 hanno un potenziale effetto su disturbi neurologici come la discinesia indotta da l-DOPA nel

morbo di Parkinson e presentano meno effetti collaterali rispetto a farmaci antagonisti recettoriali.

Il problema degli antagonisti dei recettori per il glutammato risiede nel fatto che è stato osservato uno sviluppo di tolleranza all'utilizzo cronico di questi farmaci.

Il nuovo antagonista dei recettori mGlu5, AFQ056, sembra invece non dare luogo a questo inconveniente.

Gli effetti di questo antagonista sono stati studiati su scimmie lesionate con MPTP (Gregoire *et al.*, 2011). Sono stati utilizzati 6 macachi della specie *fascicularis* a cui è stato indotto il Parkinson con la neurotossina MPTP, successivamente sono stati trattati per tre settimane con l-DOPA per ridurre i sintomi parkinsoniani. A seguito del trattamento con la levodopa hanno sviluppato discinesie. Gli animali sono stati valutati dopo aver ricevuto il veicolo che fungeva da baseline e iniezioni sottocutanee di veicolo + l-DOPA/benserazide, per sette volte. Le dosi di benserazide erano fisse (50 mg), mentre quelle di l-DOPA erano personalizzate per ogni scimmia e oscillavano da 15 a 35 mg/kg. In seguito hanno ricevuto dosi crescenti di AFQ056 (5,25,125 e 250 mg/kg) combinate alla levodopa. AFQ056 alla dose di 25 mg/kg è stato studiato anche in monoterapia.

Le dosi crescenti di AFQ056 non hanno migliorato i deficit motori causati da alte dosi di l-DOPA. A dosi minori di l-DOPA, la co-somministrazione di AFQ056 ha mostrato un buon effetto anti-Parkinson e antidiscinetico. Le dosi più efficaci di AFQ056 nella riduzione della LID sono state 25,125 e 250 mg/kg.

Viene quindi ancora una volta confermata l'ipotesi secondo la quale un'eccessiva trasmissione glutammatergica sia uno dei meccanismi alla base della LID e quindi una sua riduzione tramite un antagonista dei recettori mGlu5 può essere una ragionevole strategia terapeutica per condurre a un miglioramento della discinesia.

A questo proposito sono da sottolineare i risultati ottenuti in uno studio clinico (Berg *et al.*, 2011) a doppio cieco di 16 giorni, in cui due gruppi randomizzati di pazienti con Morbo di Parkinson e con discinesia indotta da l-dopa sono stati trattati con AFQ056 o con placebo. I pazienti trattati con AFQ056 hanno sperimentato un miglioramento della LID rispetto al gruppo trattato con il placebo e tale farmaco ha mostrato un effetto positivo sui sintomi della discinesia senza influenzare l'efficacia anti-Parkinson della terapia dopaminergica.

Tramite uno studio clinico a doppio cieco di 13 settimane (Stocchi *et al.*, 2013) è stata valutata la dose adatta di AFQ056 per il trattamento della LID. I pazienti affetti da morbo di Parkinson e da LID sono stati suddivisi in gruppi casuali e hanno ricevuto per 12 settimane placebo (n=64) oppure 20,50,100,150 o 200 mg di AFQ056 quotidianamente. Il farmaco è stato somministrato in dosi diverse a un totale di 133 pazienti. I pazienti trattati con 200 mg di AFQ056 in due somministrazioni giornaliere hanno mostrato un miglioramento significativo degli AIMs e di punteggio UPDRS (parte IV) alla dodicesima settimana, paragonati al placebo. Le reazioni avverse maggiormente riportate sono state: insonnia, diarrea, senso di fatica, allucinazioni, naso-faringiti, vertigini.

In conclusione, quindi, i recettori mGlu5 rappresentano un buon target per le terapie antidiscinetiche, ma sono necessari studi che approfondiscano gli effetti di farmaci antagonisti di questi recettori su altre aree cerebrali essendo gli mGlu5 molto espressi a questo livello. Una possibile terapia associativa tra modulatori mGlu5 e l-DOPA non deve peggiorare la qualità di vita dei pazienti parkinsoniani.

Sono stati oggetto di studio, nella terapia della LID, anche i recettori per il glutammato mGlu4 in quanto modulano negativamente il rilascio di GABA e glutammato nella via indiretta, quindi un loro agonismo può migliorare i deficit motori indotti dalla levodopa.

Interessante a questo proposito è un trial preclinico (Bennouar *et al.*, 2013) in cui si ipotizza che un trattamento combinato di l-DOPA + Lu AF21934 [modulatore allosterico positivo (PAM) del recettore per il glutammato mGlu4] permetta di ridurre le dosi di levodopa necessarie e di portare anche a una riduzione della relativa LID.

I ratti utilizzati hanno subito una lesione 6-OHDA tale da indurre il Parkinson e due settimane dopo la lesione hanno iniziato a ricevere Lu AF21934 (10 o 30 mg/kg) in due somministrazioni intraperitoneali giornaliere per un periodo di 14 giorni. Il PAM è stato iniettato da solo o in combinazione con l-DOPA (1,5 o 25 mg/kg) e benserazide (0,5 , 2,5 o 12,5 mg/kg).

La presenza di Lu AF21934 in combinazione a l-DOPA 5 mg/kg potrebbe contrastare l'iperattività glutammatergica tipica della LID e anche prevenire il priming della discinesia.

Si è però visto che, sia un modulatore positivo allosterico dei recettori mGlu4 (PAM – VU0364770) sia un agonista ortosterico (LSP1-2111), non producono una rilevante azione antidiscinetica in ratti lesionati con 6-OHDA (Iderberg *et al.*, 2015a). I due composti sembrano avere un potenziale effetto di risparmio (sparing effect) di dopamina nel Parkinson.

4.4.5 Rilascio del glutammato

Oltre che con farmaci che antagonizzano o modulino negativamente i recettori per il glutammato, si può intervenire con molecole come riluzolo o naftazone che inibiscono il rilascio di tale trasmettitore.

Il naftazone sembra avere una buona potenzialità antidiscinetica in quanto pazienti trattati con questo farmaco in un studio clinico n-of-1 a doppio cieco, mostrano un miglioramento dei sintomi della LID rispetto al gruppo trattato con il placebo (Rascol *et al.*, 2012).

Tali molecole devono ancora essere studiate per confermare la necessità terapeutica della riduzione del rilascio del glutammato nella LID e per verificare gli effetti collaterali.

Un' alternativa per contrastare l'eccessivo rilascio di glutammato potrebbe essere stimolare la up-regulation del maggiore trasportatore di glutammato (GLT-1) che va a rimuovere il glutammato presente a livello sinaptico.

Ci sono prove che l'antibiotico beta-lattamico ceftriaxone può stimolare questa up-regulation e quindi avere un'utilità terapeutica nella LID (Kelsey and Neville, 2014). Lo studio di Kelsey e Neville aveva come scopo quello di verificare che ripetute iniezioni intraperitoneali di ceftriaxone possano, come gli antagonisti del glutammato, diminuire i deficit nei movimenti delle zampe anteriori in ratti lesionati con la neurotossina 6-OHDAe quindi attenuare la LID. Nel primo esperimento sono stati esaminati gli effetti di 100 mg/kg di ceftriaxone in nove ratti (lesionati preventivamente con 6-OHDA) che hanno ricevuto la seguente terapia:

Giorno	Farmaci
1	Nessun farmaco, Baseline
2	6 mg/kg di l-DOPA
2-9	100 mg/kg ceftriaxone
10	6 mg/kg l-DOPA + 100 mg/kg di ceftriaxone
11	100 mg/kg di ceftriaxone
12-40	Nessun farmaco
41	100 mg/kg di ceftriaxone in acuto
42	Nessun farmaco

Nel secondo esperimento sono stati invece esaminati gli effetti di 50 mg/kg di ceftriaxone in 16 ratti (lesionati con 6-OHDA) trattati nel seguente modo:

Giorno	Farmaci	
	Gruppo trattato con soluzione fisiologica (n=8)	Gruppo trattato con ceftriaxone (n=8)
1	Nessun farmaco, baseline	Nessun farmaco, baseline
3-14	Soluzione fisiologica	50 mg/kg di ceftriaxone
15	6 mg/kg di l-DOPA + soluzione fisiologica	6 mg/kg di l-DOPA + 50 mg/kg di ceftriaxone
16-24	10 mg/kg di l-DOPA + Soluzione fisiologica	10 mg/kg di l-DOPA + 50 mg/kg di ceftriazone
25-31	10 mg/kg di l-DOPA + 50 mg/kg di ceftriaxone	10 mg/kg di l-DOPA + 50 mg/kg di ceftriaxone
32-33	Soluzione fisiologica + 50 mg/kg di ceftriaxone	10 mg/kg di l-DOPA (il giorno 32)
34	10 mg/kg di DHK + 50 mg/kg di ceftriaxone	Nessun farmaco
35-103	Nessun farmaco	Nessun farmaco

Nell'esperimento 1, il deficit nei movimenti delle zampe anteriori è parzialmente migliorato dopo una somministrazione in acuto di 6 mg/kg di l-DOPA combinata a sub croniche iniezioni di 100 mg/kg di ceftriaxone.

Nell'esperimento 2, il deficit motorio è migliorato da 50 mg/kg di ceftriaxone somministrati in acuto e da continue iniezioni giornaliere. 10 mg/kg di l-DOPA migliorano il deficit motorio delle zampe anteriori destre ma diminuiscono la motilità delle sinistre. Le dosi ripetute di ceftriaxone 50 o 100 mg/kg non diminuiscono invece la motilità delle zampe anteriori sinistre.

Gli effetti del ceftriaxone sono efficacemente contrastati dall'antagonista selettivo di GLT-1 , DHK (dihydrokainate), a dimostrazione del fatto che l'azione del ceftriaxone di diminuire i deficit motori è dovuta a una diminuzione del glutammato sinaptico grazie all'attivazione del GLT-1.

Le iniezioni di ceftriaxone rallentano l'evolversi degli AIMs, ma non ne influenzano l'espressione.

Il ceftriaxone a dosi sia di 50 mg/kg sia di 100 mg/kg migliora il movimento delle zampe anteriori dei ratti del 18-19 %, e, mentre gli effetti di l-DOPA svaniscono in 24 ore, l'effetto dell'antibiotico dura per circa 13-14 giorni.

Quindi rispetto a l-DOPA, ceftriaxone migliora i deficit motori causati dalla lesione con 6-OHDA dei ratti in modo più duraturo e con meno effetti collaterali, senza produrre discinesia e riesce a ridurre la velocità di sviluppo della LID.

4.5 Il sistema oppioide

Il sistema oppioide è il bersaglio di farmaci analgesici largamente utilizzati che agiscono su recettori per i peptidi oppioidi endogeni. Il naloxone è un antagonista non selettivo dei recettori oppioidi capace di inibire l'azione di questi farmaci. Il cervello contiene peptidi oppioidi endogeni suddivisi in: endorfine, metencefalina e leuencefalina e dinorfine che originano da tre precursori principali: POMC o proopiomelanocortina (che contiene le sequenze di β -endorfina e di altri peptidi non oppioidi), preproencefalina A o PPE-A (che dà origine alla leu-encefalina e alla met-encefalina) e preproencefalina B o PPE-B o preprodinorfina (che dà origine alla α -e β -neendorfina, dinorfina-A e leumorfina).

La PPE-A si ritrova nei neuroni striato-pallidali della via indiretta, mentre la PPE-B nei neuroni striato-nigrali della via diretta.

È noto anche un altro sistema molto simile a quello oppioide, il cui recettore principale è il sottotipo recettoriale simil-oppioide 1 per l'orfanina (ORL1), accoppiato a proteine G. La nocicettina o anche denominata orfanina FQ è il ligando endogeno di tale recettore e da qui deriva il nome del sistema : N/OFQ. La nocicettina differisce dalla dinorfina per la sola assenza di una tirosina N-terminale.

4.5.1 Preproencefalina e preprodinorfina

Molti studi post portem hanno rilevato, in caso di LID, alterati livelli di PPE-A mRNA e PPE-B mRNA e di conseguenza modifiche nell'espressione dei peptidi oppioidi endogeni, suggerendo un coinvolgimento del sistema oppioide nella discinesia.

Utilizzando la tecnica di spettroscopia di massa MALDI (matrix-assisted laser desorption and ionization), è stato possibile identificare i neuropeptidi presenti a livello striatale in ratti parkinsoniani e con LID (Hanrieder *et al.*, 2011). Sono stati utilizzati a tale scopo ratti femmina Sprague-Dawley che hanno subito una lesione con 6-OHDA e dopo 3 settimane dall'iniezione della neurotossina, hanno ricevuto iniezioni intraperitoneali giornaliere di 8 mg/kg di l-DOPA + 15 mg/kg di benserazide, un gruppo ha ricevuto solo soluzione fisiologica perché doveva servire da controllo. La MALDI è stata effettuata su sezioni di cervello striatale di tali ratti e i peptidi sono stati estratti da omogeneizzati tissutali, ha rilevato più di 1000 picchi con circa 3 picchi per peptide. I picchi sono stati evidenziati con diverse colorazioni. La MALDI ha prodotto i seguenti risultati:

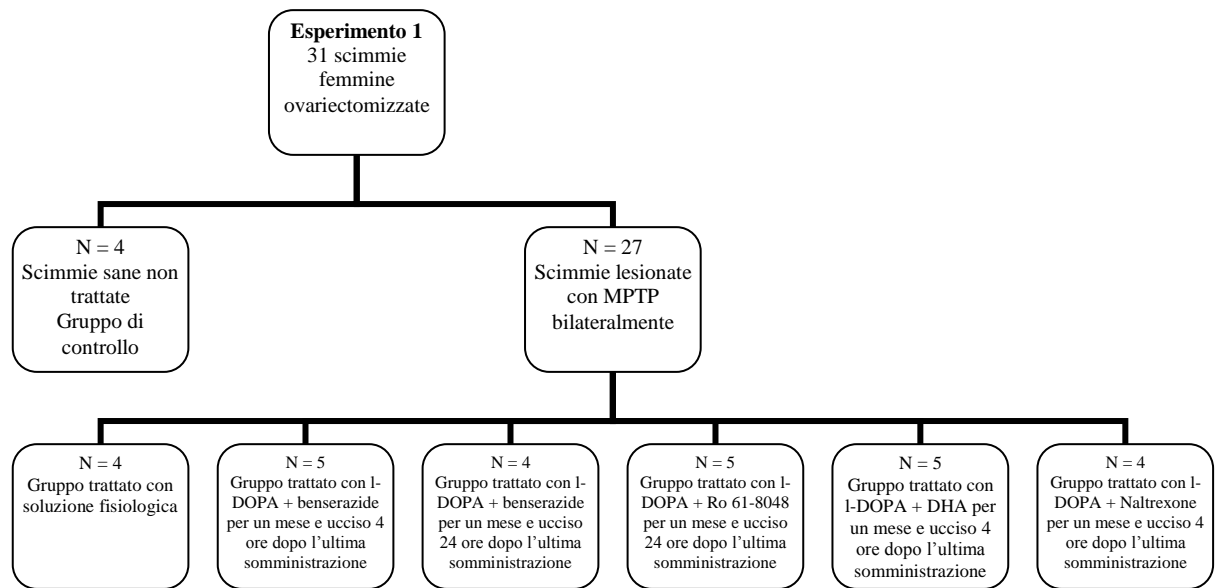
- up-regulation di mRNA della prodinorfina e di conseguenza le intensità dei picchi di prodinorfina B e di α -neoendorfina erano aumentate del 50-60 % nei ratti con discinesia grave, rispetto al controllo o ai ratti con discinesia più lieve, per quanto riguarda la

parte dorso-laterale dello striato denervato di dopamina. Questi picchi intensi erano correlati a una maggiore gravità della LID;

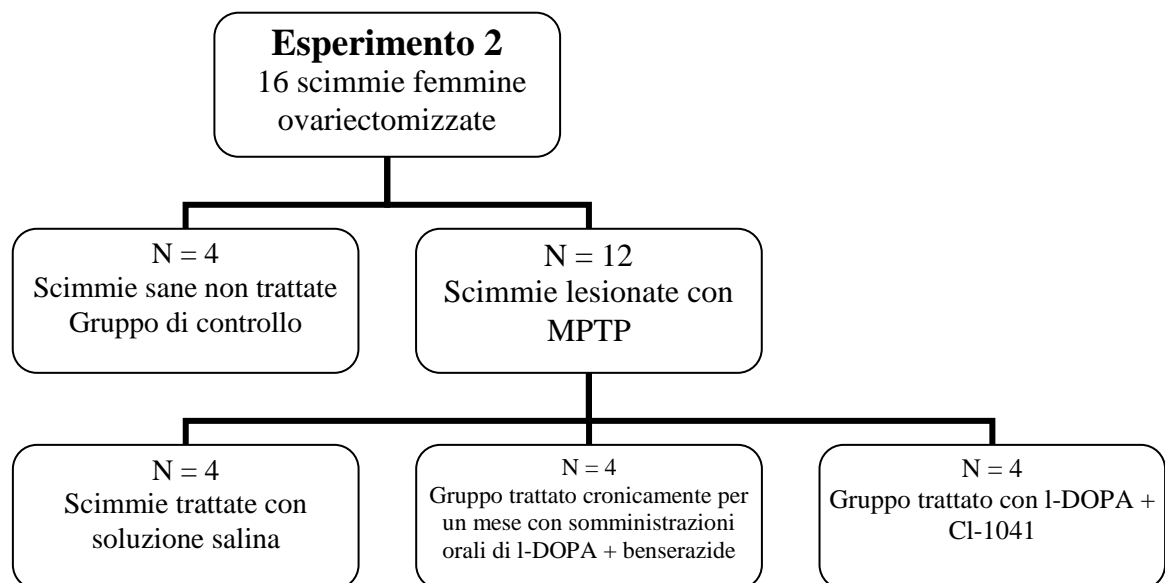
- la sostanza P era aumentata dell'11 % nella parte dorso-laterale dello striato;
- leggero aumento di prodinorfina B e di α -neoendorfina nello striato dorso mediale;
- livelli striatali di proteine collegate alla FosB e dinorfina B aumentati nei ratti con LID più grave;
- nello striato dorso-laterale dei ratti con discinesia più grave sono stati rilevati livelli aumentati di PEnk.

Tali risultati confermerebbero quindi una iperattività della via diretta dei gangli della base che esprime livelli aumentati di mRNA della prodinorfina e di sostanza P.

Questo trial preclinico ha fornito risultati simili a quelli di un precedente trial preclinico condotto su scimmie lesionate con la neurotossina MPTP (Tamim *et al.*, 2010). L'obiettivo di questo studio era quello di vedere se un trattamento non dopaminergico associato a l-DOPA per prevenire la discinesia, avesse influenza sui neuropeptidi striatali. Lo studio si è composto di due esperimenti in cui le scimmie (*Macaca Fascicularis*) sono state suddivise in gruppi come descritto dal seguente diagramma:



(Le dosi di l-DOPA + benserazide erano di 100/25 mg; Ro 61-8048 è un inibitore della chinurina idrolasi; DHA è un omega 3; Naltrexone è un antagonista non selettivo dei recettori oppioidi)



(Tutte le scimmie sono state uccise 24 ore dopo l'ultima somministrazione dei farmaci; Le dosi di l-DOPA + benserazide erano di 100/25 mg; CI-1041 è un antagonista selettivo dei recettori NMDA contenenti subunità NR2B)

Il naltrexone ha diminuito l'efficacia antiparkinson di l-DOPA, mentre invece Cl-1041, DHA e Ro 61-8048 + l-DOPA hanno ridotto i sintomi del Parkinson. I gruppi trattati con l-DOPA hanno sviluppato una discinesia prevalentemente coreica, mentre il Cl-1041 somministrato con l-DOPA ha prevenuto l'induzione della discinesia.

Per quanto riguarda i livelli di mRNA di PPE-A, erano elevati nel putamen dorsale delle scimmie lesionate con MPTP e sono rimangono aumentati nelle scimmie trattate con l-DOPA, mentre il DHA ha ripristinato valori normali di tale mRNA nel nucleo caudato ma non nel putamen dorsale. La co-somministrazione di l-DOPA e naltrexone ha aumentato i livelli di PPE-A mRNA nel putamen dorsale e nel nucleo caudato e le scimmie così trattate hanno sviluppato discinesia, mentre le scimmie trattate con l-DOPA+ Cl-1041 o DHA non hanno sviluppato discinesia e i valori di PPE-A mRNA sono rimasti praticamente uguali a quelli del gruppo di controllo. I livelli di mRNA di preprodinorfina (PPD mRNA) hanno subito un aumento nelle scimmie lesionate con MPTP e trattate con l-DOPA e un ulteriore aumento nei gruppi trattati con l-DOPA + Ro 61-8048 o Naltrexone. Tali livelli erano invece vicini a valori normali nei gruppi trattati con l-DOPA + Cl-1041 o DHA.

I livelli di mRNA di Preprotakinina A (PPT-A mRNA) non hanno subito variazioni in alcun gruppo.

La gravità della discinesia nelle scimmie lesionate con MPTP è risultata correlata positivamente ai livelli di PPD mRNA e di PPE-A mRNA nel primo esperimento, mentre non si osservata una correlazione tra PPT-A mRNA e discinesia.

Non è stata rilevata una differenza significativa dei livelli di mRNA dei neuropeptidi tra i gruppi che ricevevano mRNA. La somministrazione di Ro 61-8048 non ha aiutato a prevenire la LID, come è successo invece nei gruppi che ricevevano Cl-1041. Ro 61-8048 è un inibitore della

chinurenina idrolasi che devia la via catabolica del triptofano a produrre acido chinurenico che funge da antagonista per i recettori del glutammato. L'attività benefica nei confronti dei livelli di mRNA dei neuropeptidi, svolta dal DHA, è probabilmente dovuta al fatto che è un attivatore endogeno di fattori di trascrizione.

Essendo dunque i livelli striatali di PPE-A mRNA e PPD mRNA aumentati in caso di discinesia, è confermato ancora una volta il loro coinvolgimento nella LID e un approccio terapeutico potrebbe essere quello di sviluppare molecole, ligandi per i recettori oppioidi che influenzino questi livelli.

Un' ulteriore prova del coinvolgimento di tali sostanze nella LID viene fornita da un'indagine con spettroscopia di massa MALDI effettuata su ratti lesionati con 6-OHDA (Ljungdahl *et al.*, 2011). Dopo 3 settimane dalla lesione, i ratti hanno ricevuto giornalmente per un periodo di 15 giorni, 8 mg/kg di l-DOPA + 15 mg/kg di benserazide. La discinesia è stata valutata ogni giorno e i ratti sono stati suddivisi in due gruppi sulla base della gravità della LID: HD (LID + grave; n = 6) e LD (LID – grave; n = 11). Le immagini della MALDI hanno rivelato: un aumento del 44 % dei picchi di intensità di dinorfina B e del 26% dei picchi di intensità di α -neoendorfina nella regione di substantia nigra ipso-laterale alla lesione che ha condotto alla denervazione di dopamina. L'intensità dei picchi dei due neuropeptidi è correlata alla gravità della LID. L'immunoreattività della dinorfina B è aumentata del 63% nel gruppo di animali HD, nella parte laterale della substantia nigra e del 39% nella parte mediale della substantia nigra.

In conclusione, il trattamento continuativo con l-DOPA causa una up-regulation di livelli di mRNA della prodinorfina e un aumento di dinorfina B e α -neoendorfina nella substantia nigra strettamente correlati alla gravità della LID. Analizzando anche i metaboliti della dinorfina, principalmente Leu-Enk-Arg, dimostrano anch'essi una correlazione tra intensità dei picchi e espressione della LID.

In un altro recente studio preclinico (Bourdenx *et al.*, 2014), è stato dimostrato che in caso di Parkinson e LID, i livelli di PPE-A, PPE-B e sostanza P sono decisamente aumentati nel globus pallidus interno e esterno.

4.5.2 Nocicettina / Orfanina FQ

Il neuropeptide nocicettina / orfanina FQ (N/OFQ) è già stato visto essere implicato nel Parkinson (Marti *et al.*, 2010; Marti *et al.*, 2012). È quindi opportuno analizzare se il neuropeptide ha un ruolo nella LID. Uno studio preclinico ha di fatti dimostrato che il neuropeptide N/OFQ è coinvolto anche nella discinesia indotta da l-DOPA (Marti *et al.*, 2012) tramite esperimenti in vivo su ratti, topi e macachi. Gli esperimenti sui ratti sono stati condotti su un totale di 126 ratti discinetici emi-lesionati con 6-OHDA, 10 ratti emi-lesionati con 6-OHDA drug-naive e 14 ratti che fungevano da gruppo placebo, secondo la seguente tabella :

Esperimento con agonisti del recettore NOP		
20 animali discinetici hanno ricevuto soluzione fisiologica o 3 dosi di N/OFQ , On e Off l-DOPA	20 animali trattati con soluzione fisiologica o 3 dosi differenti di Ro 65-6570 , On e Off l-DOPA	
Esperimenti di microdialisi		
6 animali discinetici hanno ricevuto tramite microdialisi per 4 giorni i seguenti trattamenti in modo randomizzato : soluzione fisiologica, l-DOPA, N/OFQ e l-DOPA + N/OFQ		
Esperimenti con antagonisti del recettore NOP		
10 animali discinetici hanno ricevuto l-DOPA + soluzione fisiologica o	10 animali hanno ricevuto l-DOPA + soluzione fisiologica o J-113397	Soluzione fisiologica, UFP-101 e J-113397

UFP-101		sono stati anche somministrati in esperimenti separati, Off 1-DOPA, per misurare l'impatto dei singoli antagonisti di NOP sui movimenti rotatori
Esperimenti con microiniezioni regionali		
10 ratti discinetici con una cannula nella substantia nigra pars reticulata e 10 con la cannula nello striato dorso-laterale hanno ricevuto soluzione fisiologica o 3 dosi di N/OFQ + l-DOPA	10 ratti con cannula sia nella substantia nigra pars reticulata sia nello striato dorso-laterale, hanno ricevuto una singola dose di N/OFQ	
Esperimenti di associazione		
20 animali discinetici hanno ricevuto soluzione fisiologica, N/OFQ (0,1 nmol), UFP-101 (10 nmol) o N/OFQ + UFP-101, in associazione con l-DOPA		
Esperimenti di auto-radiografia		
Sezioni di cervello di 8 ratti del gruppo di controllo, 10 ratti emi-lesionati con 6-OHDA e 10 ratti discinetici, sono state analizzate		

Gli esperimenti sui topi sono stati condotti per analizzare in vivo la selettività di Ro 65-6570 e l'attività motoria è stata valutata nei topi drug-

naive NOP ^{+/+} e NOP ^{-/-}. Ciò ha permesso di valutare la capacità dei topi di bilanciare la propria postura in risposta a stimoli dinamici esterni.

Gli esperimenti sui macachi hanno coinvolto 5 macachi (*Macaca fascicularis*) trattati quotidianamente (ore 9.00) con MPTP per 2 mesi e successivamente con l-DOPA/carbidopa di modo da sviluppare discinesia.

I risultati di tale studio sono stati:

- gli agonisti del recettore NOP possono attenuare la LID, di fatti la N/OFQ (0,03-1 nmol) migliora la performance rotazionale degli animali e Ro 65-6570 (0,01-1 mg/kg) migliora i movimenti nei topi NOP ^{+/+}. Tali effetti positivi sulla LID sono stati invece prevenuti dalla somministrazione degli antagonisti del recettore NOP, UFP-101 e J-113397;
- la microdialisi ha rivelato che la N/OFQ (0,1 nmol) attenua la gravità della LID e il rilascio di aminoacidi nella substantia nigra e aumenta il rilascio di GABA nella pars reticulata della substantia nigra che è inibito dall'attivazione della via diretta striato-nigrale nella LID;
- gli antagonisti del recettore NOP, UFP-101 (10 nmol) e J-113397 (3 mg/kg) hanno peggiorato i movimenti anomali involontari;
- le microiniezioni hanno mostrato che: la N/OFQ all'interno della substantia nigra riduce i movimenti anomali involontari alle dosi di 0,1 nmol, mentre nel corpo striato sono sufficienti dosi di 0,03 nmol per ridurre tali movimenti. Nella substantia nigra l'antagonista del recettore NOP, UFP-101, peggiora i movimenti anomali involontari e previene l'effetto antidiscinetico della N/OFQ;
- l'auto-radiografia ha rilevato che, sia la lesione con 6-OHDA sia la discinesia, causano un aumento dei legami tra il recettore NOP e il suo ligando nello striato e una riduzione di questi legami nella substantia nigra;
- l'agonista del recettore NOP, Ro 65-6570, alle dosi di 0,01 mg/kg, riduce significativamente i movimenti discinetici, accorciandone anche la durata,

senza influenzare l'effetto terapeutico della levodopa su tremore e bradicinesia.

L'attivazione del recettore NOP si oppone, quindi, all'iperattività dei recettori D₁ up-regolati nello striato in caso di LID e la N/OFQ previene l'aumento della fosforilazione delle Erk mediata dai recettori D₁. I recettori NOP nello striato dei ratti lesionati con 6-OHDA sono up-regolati probabilmente per compensare la riduzione di N/OFQ derivata dalla denervazione della dopamina e quindi gli agonisti di questi recettori possono ristabilire l'equilibrio inibitorio esercitato dalla nocicettina sulla via di segnalazione dei recettori D₁, il vantaggio è che possono funzionare come antagonisti funzionali della dopamina a dosi che non influenzano l'attività anti-Parkinson della l-DOPA. Lo studio prova anche il coinvolgimento della substantia nigra nella LID in quanto la nocicettina attenua la discinesia quando viene iniettata nella SNr. Nella pars reticulata della substantia nigra i livelli di dopamina sono alterati dal metabolismo della l-DOPA e inducono discinesia attivando recettori D₁ e D₂. Gli agonisti del recettore NOP potrebbero essere una valida strategia clinica per attenuare gli effetti della LID.

4.5.3 Recettori oppioidi

I recettori per gli oppioidi sono suddivisi in μ , δ , κ . I recettori μ sono responsabili dell'analgesia soprasspinale e spinale, della sedazione e inibizione della respirazione, rallentano il transito gastro-intestinale e modulano il rilascio di ormoni e neurotrasmettitori; i δ modulano il rilascio di ormoni e neurotrasmettitori; i κ danno analgesia spinale e soprasspinale, effetti psicotomimetici e rallentano anch'essi il transito gastro-intestinale. I peptidi oppioidi endogeni hanno la seguente affinità per i diversi sottotipi recettoriali:

- μ : endorfina > encefaline > dinorfine;
- δ : encefaline > endorfine e dinorfine;
- κ : dinorfine >> endorfine e encefaline.

I recettori oppioidi sembrano implicati o comunque mostrano dei livelli alterati nella LID. Per quanto riguarda i recettori μ , i loro livelli sono ridotti nello striato e nel globus pallidus interno di scimmie discinetiche e nel caudato e putamen di pazienti parkinsoniani trattati con l-DOPA, ma sono aumentati nella corteccia motoria e pre-motoria di ratti discinetici lesionati con 6-OHDA se paragonati a animali non discinetici (Huot *et al.*, 2013a).

Uno studio post mortem con [35 S]GTP γ S (marker che misura l'attivazione dei recettori accoppiati a proteine G stimolati da agonisti) ha mostrato che l'attivazione dei recettori μ è significativamente aumentata nei gangli della base e nella corteccia di scimmie discinetiche (Chen *et al.*, 2005). Lo studio è stato condotto su 22 scimmie adulte (*Saimiri sciureus*) lesionate con MPTP e successivamente tratte con l-DOPA e suddivise in cinque gruppi:

- animali con discinesia trattati con l-DOPA (n=4);
- animali senza discinesia trattati con l-DOPA (n=3);
- animali lesionati e trattati solo con acqua (n=5);
- animali lesionati con MPTP e trattati con l-DOPA con discinesia (n=5);
- animali non lesionati trattati con acqua (n=5).

I risultati, ottenuti mediante auto-radiografia, hanno mostrato un'iperattività delle vie di trasduzione del segnale mediate dal recettore oppioide μ nello striato e nel globus pallidus interno delle scimmie discinetiche, aumento che non si è verificato negli animali senza discinesia. Così come per i recettori μ , anche le vie di trasduzione del segnale mediate dai recettori δ sembrano essere aumentate nella LID in quanto alcuni recettori δ striatali si ritrovano sulle terminazioni dei neuroni

glutammatergici cortico-striatali modificando il rilascio del glutammato e di conseguenza della dopamina (Billet *et al.*, 2004; Billet, 2007)

Uno studio preclinico che ha testato il coinvolgimento di questi recettori nei movimenti involontari anomali tipici della LID in ratti emi-parkinsoniani (Billet *et al.*, 2012) ha rilevato che la trasmissione ad opera dei recettori δ modula l'espressione della discinesia indotta da l-DOPA con un particolare coinvolgimento dei recettori collocati sui neuroni cortico-striatali. Tale studio ha utilizzato ratti resi emi-parkinsoniani con la neurotossina 6-OHDA e resi successivamente discinetici con l-DOPA. Gli animali sono stati trattati con un agonista del recettore oppioide δ [D-Pen², D-Pen⁵]-enkephalin (DPDPE) e con un antagonista di questo recettore, naltrindolo.

Il DPDPE ha aggravato l'espressione e la gravità della LID indicando la presenza di un legame fra la discinesia e l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale mediate dai recettori δ , mentre il naltrindolo ha migliorato i sintomi della LID essendo un antagonista di questi recettori. Lo studio dimostra inoltre che i recettori maggiormente coinvolti sono quelli presenti sulle terminazioni dei neuroni cortico-striatali e la densità di questi recettori nello striato aumenta molto negli animali discinetici. La capacità di questi recettori, se stimolati, di aggravare i sintomi motori derivati dalla discinesia indotta da l-DOPA potrebbe quindi risiedere nella loro abilità di aumentare il rilascio di glutammato nello striato. Poiché le encefaline endogene, che agiscono principalmente sui recettori δ , sono in grado di modulare il rilascio di dopamina, un aumento della trasmissione di questi recettori osservata nei ratti discinetici in seguito a deplezione della dopamina striatale potrebbe essere un meccanismo di compensazione atto a ristabilire i livelli di dopamina, il quale porterebbe però a una sovra-stimolazione di questi recettori.

Si ritiene che tale stimolazione derivi da un'incapacità, in caso di discinesia, a operare una downregulation sull'espressione recettoriale a livello striatale.

Un messaggio importante di questo studio è il possibile utilizzo di farmaci antagonisti del recettore oppioide δ come strategia terapeutica per attenuare la LID.

Fino ad ora abbiamo quindi osservato che i recettori μ e δ sono coinvolti nella discinesia indotta da l-DOPA e un aumento della loro espressione e della stimolazione delle loro vie di trasduzione del segnale è un meccanismo che contribuisce ad aggravare l'espressione della LID.

Riguardo al recettore κ , al contrario degli altri due tipi recettoriali, un suo agonismo sembra essere utile nell'attenuare la discinesia in quanto i suoi livelli risultano ridotti nel globus pallidus interno e esterno di animali trattati cronicamente con l-DOPA (Huot *et al.*, 2013a).

A questo proposito è stato studiato l'agonista selettivo dei recettori κ , U50,488, come possibile terapia della LID (Cox *et al.*, 2007) e ne è risultato che il suo uso clinico come antidiscinetico non è attuabile in quanto ha un buon effetto di riduzione dei movimenti anomali involontari provocati dalla LID ma peggiora l'effetto anti-Parkinson della l-DOPA e di conseguenza la qualità di vita dei pazienti. Lo studio è stato effettuato su ratti e su scimmie dal momento che nelle scimmie i sintomi del Parkinson e della LID sono ben differenziati e l'espressione della discinesia è molto simile a quella dei pazienti affetti da queste patologie. I ratti, Sprague-Dawley, sono stati trattati con 6-OHDA e l-DOPA allo scopo di provocare Parkinson e discinesia e in seguito hanno ricevuto per un periodo di due settimane, U50,488: la prima settimana 2 ratti hanno assunto U50,488 3mg/kg e altri 2 soluzione fisiologica 25 minuti prima della l-DOPA; nella seconda settimana la tendenza è stata invertita. Quattro scimmie femmine adulte (*Saimiri sciureus*) hanno ricevuto la neurotossina MPTP e l-DOPA

come induttori di Parkinson e LID e sono state trattate per 5 giorni con U50,488 secondo il seguente schema:

Giorno	Farmaco
1	1 mg/kg di U50,488
2	0,1 mg/kg di U50,488
3	0,25 mg/kg di U50,488
4	0,15 mg/kg di U50,488
5	0,15 mg/kg di U50,488

La somministrazione di 3 mg/kg di U50,488 25 minuti prima della l-DOPA nei ratti ha ridotto del 70 % la sintomatologia legata ai movimenti anomali involontari provocati dalla LID rispetto al gruppo trattato con soluzione fisiologica, mentre la somministrazione dell'agonista immediatamente precedente a 5 mg/kg di l-DOPA nelle scimmie ha avuto effetti differenti in base alle concentrazioni iniettate. Alle dosi di 0,15 mg/kg, 0,25 mg/kg e 1 mg/kg si è assistito a una diminuzione dei movimenti discinetici, che è stata però accompagnata da un peggioramento dei sintomi parkinsoniani alle dosi più elevate di U50,488 (0,25 e 1 mg/kg).

La riduzione dell'espressione della LID è stata valutata mediante analisi dell'AUC della durata dei movimenti discinetici.

Le dosi più elevate di U50,488 hanno prodotto anche effetti collaterali come vomito e sedazione che invece non si sono manifestati alle dosi di 0,1 mg/kg, questa bassa concentrazione però non ha nemmeno avuto effetti positivi sulla LID.

Questi risultati confermano l'ipotesi che i recettori oppioidi κ giocano un ruolo importante nei meccanismi alla base della discinesia, ma non forniscono una valida strategia terapeutica poiché l'agonista selettivo di questi recettori U50,488 ha una finestra terapeutica troppo stretta e alle dosi efficaci per la LID risulta non tollerato per i suoi effetti collaterali e per il

peggioramento dei sintomi parkinsoniani, non è quindi utilizzabile in clinica.

Sulla scia di quanto descritto sopra, è stato studiato l'effetto sulla discinesia indotta da l-DOPA di un altro agonista selettivo per i recettori oppioidi κ , TRK-820 (Ikeda *et al.*, 2009). In questa analisi preclinica i ratti sono stati resi emi-parkinsoniani con 6-OHDA e discinetici con l-DOPA e sono stati effettuati 3 diversi esperimenti.

Nell'esperimento A i ratti discinetici sono stati trattati con TRK-820 o con amantadina subito dopo aver ricevuto l-DOPA + benserazide alle dosi di 20/5 mg/kg per valutare gli effetti dell'agonista dei recettori κ sulla discinesia indotta da l-DOPA. Nell'esperimento B sono stati valutati gli effetti del TRK-820 sui livelli di dopamina presenti in caso di discinesia utilizzando la microdialisi in vivo. Gli animali in questo caso hanno ricevuto il placebo, oppure acqua distillata dopo l-DOPA + benserazide (20/5 mg/kg) oppure il TRK-820 subito dopo la l-DOPA+ benserazide.

L'esperimento C ha osservato invece gli effetti della combinazione tra TRK-820 e l-DOPA nello sviluppo della LID su ratti emi-parkinsoniani trattati nei giorni 1,3,7,15 e 21 con il placebo oppure con TRK-820 (3 o 10 μ g/kg) subito dopo la somministrazione di l-DOPA + benserazide (20/5 mg/kg) e poi di nuovo con l-DOPA + benserazide (20/5 mg/kg). Nei giorni seguenti i ratti hanno ricevuto il placebo oppure TRK-820 + l-DOPA/benserazide (40/10 mg/kg).

I risultati dei tre esperimenti sono descritti nella tabella seguente:

ESPERIMENTO A
Il TRK-820 somministrato in acuto alle dosi di 10 e 30 μ g/kg per via sottocutanea ha inibito efficacemente i sintomi della LID in modo dose-dipendente e , rispetto alle dosi necessarie di amantadina per avere lo stesso

effetto (40 mg/kg), risulta molto più potente nel controllo della LID rispetto all'amantadina. Il beneficio prodotto dal TRK-820 sulla discinesia indotta da l-DOPA è stato completamente annullato dalla somministrazione di un antagonista dei recettori oppioidi κ , nor-BNI (20 mg/kg).
ESPERIMENTO B
I livelli di dopamina extracellulari nello striato dei ratti emi-parkinsoniani non sono stati modificati dall'iniezione di 30 μ g/kg di TRK-820, tali livelli sono stati alterati invece dalla stessa somministrazione preventiva di TRK-820 nei ratti discinetici.
ESPERIMENTO C
Il trattamento con TRK-820 (3 e 10 μ g/kg) ha significativamente inibito lo sviluppo dei sintomi della LID a partire dal terzo giorno dell'esperimento.

Si può quindi concludere che l'effetto del TRK-820 sulla LID è paragonabile a quello dell' amantadina ma con il vantaggio di essere più potente e quindi attivo a dosi più basse. La sua azione antidiscinetica è dovuta al suo agonismo selettivo nei confronti dei recettori oppioidi κ in quanto un antagonista di questi recettori, nor-BNI, annulla l'effetto del farmaco.

Al contrario dell' U50,488 visto prima, il TRK-820 sembra non dare gli effetti collaterali e il peggioramento dei sintomi parkinsoniani e quindi, grazie alla sua più ampia finestra terapeutica, è favorevole a un trattamento clinico della LID.

Il TRK-820 potrebbe esercitare la sua azione antidiscinetica andando a ristabilire l'equilibrio nei livelli dei recettori κ , che sono diminuiti nella LID e portano a un eccesso di liberazione di dopamina.

Uno studio recente su scimmie lesionate con MPTP ha avuto come obiettivo la valutazione dell'efficacia di un analgesico ad attività mista in quanto agonista dei recettori oppioidi κ e antagonista dei recettori oppioidi

μ, nalbufina, nel ridurre la LID e i markers biologici ad essa correlati (Potts *et al.*, 2015).

Sei scimmie adulte (*Macaca fascicularis*) sono state rese parkinsoniane con MPTP e discinetiche con levodopa + carbidopa (Sinemet ®) e hanno ricevuto l'analgessico nalbufina in tre modalità differenti:

- in monoterapia: alle dosi di 0 mg/kg (placebo), 0,016 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,16mg/kg e 0,5 mg/kg;
- in associazione con la l-DOPA: somministrazione in acuto di nalbufina alle dosi di 0 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,13 mg/kg e 0,25 mg/kg subito prima della somministrazione della l-DOPA per verificare l'effetto dell'analgessico sulla LID e sull'azione anti-Parkinson della levodopa;
- come trattamento cronico: la nalbufina alle dosi di 0,13 mg/kg è stata somministrata quotidianamente con il Sinemet per un mese allo scopo di valutarne lo sviluppo di tolleranza e la comparsa di reazioni avverse. Le valutazioni sono state eseguite nei giorni 0, 14, 15, 30, 31, 37 e 38.

L'attività motoria degli animali è stata valutata con una scala apposita (PMS) per le scimmie trattate con MPTP, mentre gli effetti del farmaco sul sistema nervoso centrale come la sedazione sono stati valutati con la scala DENS (Drug Effects on the Nervous System).

La nalbufina in combinazione con la l-DOPA ha mostrato una significativa capacità di ridurre l'intensità della LID, ma non la sua durata, alle dosi comprese tra 0,06 e 0,25 mg/kg (dose più efficace 0,13 mg/kg) senza influenzare l'effetto anti-Parkinson della levodopa e senza causare sedazione negli animali come rilevato dalla scala DENS. La presenza di nalbufina non ha comportato modifiche nella farmacocinetica della l-DOPA dimostrando che i suoi effetti inibitori sulla LID sono dovuti a interazioni con i suoi recettori e non a alterazioni della concentrazione di l-DOPA

plasmatica. La somministrazione cronica per un mese di nalbufina ha mostrato un effetto anti-LID molto efficace a partire dalla seconda settimana di trattamento che si è annullato dopo un mese, una volta interrotto il trattamento con l'analgescico. Durante questa co-somministrazione cronica di nalbufina e Sinemet non si è osservata sedazione né alterazione dell'attività anti-Parkinson della l-DOPA. Tali risultati suggeriscono una buona efficacia della nalbufina come terapia cronica della LID, avvantaggiata dall'assenza di pesanti effetti indesiderati centrali.

Per quanto riguarda i markers biologici della LID, essi sono stati valutati a livello del putamen di 4 scimmie discinetiche non trattate con nalbufina e 3 scimmie discinetiche trattate con nalbufina + l-DOPA. Il gruppo trattato con nalbufina ha mostrato una diminuzione di circa il 50 % dei livelli di Δ FosB, una riduzione dei livelli di dinorfina A e prodinorfina rispettivamente del 80% e 51%. La fosforilazione a livello del residuo tirosinico 34 della DARPP-32, che nella LID è up-regolata, è stata ridotta del 45% negli animali trattati con nalbufina, così come l'aumento, tipico della LID, dell'espressione della Cdk5 (chinasi 5 ciclina-dipendente) ha subito una diminuzione del 52% in presenza di nalbufina. I livelli della Erk non sono invece differenti tra i due gruppi.

La nalbufina somministrata in monoterapia non ha prodotto effetti motori sulle scimmie parkinsoniane né reazioni avverse significative, tranne che alla dose massima di 0,5 mg/kg che ha scaturito sedazione negli animali.

La conclusione di questo studio preclinico è quindi che un farmaco con azione mista agonista dei recettori κ e antagonista dei recettori μ co-somministrato con la levodopa ha una valida efficacia anti-LID in scimmie parkinsoniane discinetiche senza compromettere gli effetti antiparkinsoniani e la farmacocinetica della l-DOPA e senza causare reazioni avverse neurologiche significative.

Un'ulteriore conferma dell'attività antidiscinetica della nalbufina è rappresentata dalla riduzione dei livelli dei markers biologici striatali della discinesia indotta da l-DOPA.

La grande importanza di questo analgesico come possibile terapia della LID risiede inoltre nel fatto che le dosi necessarie per la sua attività antidiscinetica sono più basse di quelle utilizzate normalmente come analgesico e il suo profilo di sicurezza è dimostrato da oltre 3 decenni di utilizzo. Il prossimo passo sarà quindi testarlo in un trial clinico per confermare la sua efficacia sui pazienti discinetici.

4.6 Il sistema serotoninergico

Anche il sistema serotoninergico risulta essere implicato nella discinesia indotta da l-DOPA in quanto, una volta che i neuroni dopaminergici sono in via di degenerazione nei pazienti affetti da Parkinson, altri sistemi sono coinvolti nella produzione di dopamina come, ad esempio, i neuroni serotoninergici dello striato che possono rilasciare la dopamina come falso neurotrasmettitore (Sharma *et al.*, 2015). La dopamina così rilasciata va a sommarsi a quella introdotta oralmente con la levodopa causando una stimolazione pulsatile dei recettori dopaminergici in quanto i neuroni serotoninergici mancano di un meccanismo di controllo a feedback dei livelli di dopamina sinaptici. L'attività della serotonina (5-HT) può essere inibita con la stimolazione dei suoi recettori pre-sinaptici 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}. In modelli di Parkinson animali la LID è stata quasi completamente inibita dalla rimozione delle afferenze serotoninergiche e da farmaci agonisti dei recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} a basse dosi (Carta *et al.*, 2007).

Utilizzando la PET e radioligandi markers della funzione serotoninergica e dopaminergica, è stato possibile osservare che i neuroni serotoninergici

contribuiscono all'induzione della discinesia indotta da l-DOPA aumentando i livelli sinaptici di dopamina nei pazienti affetti dal Morbo di Parkinson e che alterando la funzionalità della serotonina è possibile frenare il rilascio di dopamina e migliorare la LID (Politis *et al.*, 2014).

La PET è stata utilizzata anche in un altro studio clinico atto ad investigare il ruolo dei neuroni serotoninergici del globus pallidus nello sviluppo della LID con l'ipotesi che la funzione terminale della serotonina nel globus pallidus sia up-regolata (Smith *et al.*, 2015). La tecnica è stata applicata su 24 pazienti affetti da Morbo di Parkinson e 12 pazienti sani come gruppo di controllo. I markers analizzati sono stati: ^{11}C -DASB (marker della disponibilità del trasportatore di serotonina) e ^{11}C -raclopride (marker dei livelli di dopamina). Tutti i pazienti malati di Parkinson avevano ricevuto l-DOPA/carbidopa (250/25 mg). I livelli di ^{11}C -DASB non sono diminuiti e risultano essere correlati con la gravità della LID, i livelli di ^{11}C -raclopride diminuiscono dopo la somministrazione di l-DOPA nei pazienti con LID piuttosto che nei pazienti con Parkinson stabile in quanto in caso di discinesia si ha un rilascio maggiore di dopamina in seguito a l-DOPA. Si deduce quindi che la funzione terminale della serotonina nel globus pallidus di pazienti parkinsoniani discinetici è mantenuta, oppure avviene un adattamento delle proiezioni serotoninergiche terminali rimanenti, oppure si ha una up-regulation dei siti di legame del trasportatore di serotonina in questi pazienti. La trasmissione serotoninergica gioca quindi un ruolo fondamentale nella discinesia convertendo e immagazzinando la dopamina esogena per rilasciarla poi come falso neurotrasmettitore, di fatti i livelli di raclopride diminuiscono nei pazienti con LID dopo somministrazione di l-DOPA perché i recettori D_2 vengono occupati dalla dopamina rilasciata in grande quantità dalle terminazioni serotoninergiche aumentando l'output motorio; cosa che non avviene nei pazienti

parkinsoniani non discinetici e nel gruppo di controllo, dove la disponibilità recettoriale rimane uguale anche dopo somministrazione di levodopa.

Analizzando la relazione tra serotonina e LID in un'indagine eseguita su 44 pazienti parkinsoniani e 17 controlli è stato al contrario dimostrato che i livelli dei markers di serotonina nello striato non mostravano particolari differenze tra i pazienti discinetici e quelli non discinetici e non erano correlati alla gravità della discinesia suggerendo che l'integrità del sistema serotoninergico non è un fattore di rischio per la LID (Cheshire *et al.*, 2015). Lo studio di (Cheshire *et al.*, 2015) contraddice quindi l'ipotesi che la LID sia una conseguenza di un' aumento dell'innervazione serotoninergica nello striato e che la degenerazione del sistema serotoninergico sia protettiva nei confronti della discinesia indotta da l-DOPA.

4.6.1 I recettori serotoninergici 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}

I recettori serotoninergici 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} sono recettori metabotropici accoppiati a proteine G_i e quindi la loro stimolazione frena il rilascio di serotonina.

“Il potenziale effetto sinergico di basse dosi di farmaci agonisti dei recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} nel sopprimere la discinesia, senza influenzare l'effetto anti-Parkinson della l-DOPA in presenza di terminali dopaminergici risparmiati, suggerisce un uso precoce di questi farmaci per contrastare lo sviluppo della discinesia nei pazienti con Morbo di Parkinson “ (Carta *et al.*, 2007).

Studiando l'effetto del buspirone, farmaco agonista dei recettori serotoninergici 1A, somministrato prima della l-DOPA, sul controllo della LID la sua azione sembra principalmente dovuta alla riduzione del rilascio

di dopamina causata dal suo agonismo a livello dei recettori 1A (Politis *et al.*, 2014).

È stata recentemente studiata l'attività di farmaci agonisti parziali dei recettori 5-HT_{1A} su modelli animali di Parkinson e di discinesia indotta da l-DOPA paragonando l'attività di F13714 che attiva preferenzialmente gli auto-recettori serotoninergici 1A pre-sinaptici, l'attività di F15599 che attiva preferenzialmente gli eterorecettori serotoninergici 1A post-sinaptici corticali e l'attività dell'agonista parziale di tali recettori, tandospirone, che non distingue i tipi recettoriali detti sopra (Iderberg *et al.*, 2015b). Gli esperimenti sono stati condotti su:

- 75 ratti emi-parkinsoniani lesionati con 6-OHDA e con discinesia indotta da trattamento cronico giornaliero con l-DOPA/benserazide alle dosi di 6/12 mg/kg per 3 settimane. I ratti discinetici sono stati suddivisi in 3 gruppi che ricevevano in combinazione con la l-DOPA uno dei tre farmaci in studio: F13714, F15599 oppure il tandospirone. L'antagonista selettivo del recettore 5-HT_{1A} WAY100635 (0,63 mg/kg) è stato utilizzato per verificare che l'effetto dei 3 farmaci fosse dipendente dal loro agonismo a livello del recettore 1A;

- 33 ratti emi-parkinsoniani lesionati con 6-OHDA suddivisi in 3 gruppi da 11 animali ciascuno e trattati con F13714 oppure F15599 oppure con tandospirone da soli e anche in combinazioni con dosi subliminari di 2 mg/kg. L'effetto dei tre farmaci sul recettore 1A è stato confermato con l'antagonista WAY100635.

Gli esperimenti di microdialisi sono stati eseguiti su ratti suddivisi in gruppi lesionati con 6-OHDA a cui è stata impiantata una cannula nello striato per verificare i livelli extracellulari di serotonina, dopamina, glutammato e GABA dopo ogni somministrazione acuta di F13714 (0,04 o 0,16 mg/kg) e F15599 (0,16 o 0,64 mg/kg). Gli AIMs sono stati valutati nel test del cilindro e in test rotazionali.

Alla fine i ratti sono stati trattati con la tirosina idrossilasi immunoistochimica per verificare l'estensione della denervazione nigrostriatale.

I risultati degli esperimenti sono riportati nella seguente tabella:

<p>EFFETTI DELL'AGONISTA PARZIALE DEI RECETTORI 5-HT_{1A} PRESINAPTICI F13714</p>
<p>Alle dosi di 0,01 mg/kg + l-DOPA gli AIMs totali non sono stati ridotti in modo significativo, mentre alle dosi di 0,02 e 0,04 mg/kg + l-DOPA gli AIMs hanno subito una forte e significativa riduzione dose-dipendente e questo effetto è stato completamente rovesciato dalla somministrazione dell'antagonista dei recettori 1A, WAY100635 0,63 mg/kg. L'agonista non ha interferito con l'attività anti-Parkinson della l-DOPA. La microdialisi non ha rilevato differenze nei livelli di serotonina, glutammato e GABA nello striato dei ratti lesionati e non lesionati, mentre i livelli di dopamina erano ridotti > 90% nello striato lesionato. Alle dosi di 0,04 e 0,16 mg/kg, l' F13714 ha generato una riduzione importante dei livelli di 5-HT nello striato lesionato e non lesionato, ma non ha avuto alcun effetto sui livelli di glutammato e GABA. I livelli di dopamina sono leggermente aumentati nello striato non lesionato in seguito a 0,16 mg/kg di F13714, mentre non ci sono state differenze significative nello striato lesionato.</p>
<p>EFFETTI DELL'AGONISTA PARZIALE DEI RECETTORI 5-HT_{1A} POSTSINAPTICI F15599</p>
<p>Alle dosi di 0,04 e 0,08 mg/kg + l-DOPA gli AIMs totali non hanno subito differenze significative, mentre alle dosi di 0,16 mg/kg gli AIMs sono stati ridotti di circa l'80% e tale effetto è stato efficacemente antagonizzato dal WAY100635. L'agonista F15599 non ha influenzato l'attività anti-Parkinson della l-DOPA. La microdialisi non ha rilevato differenze nei</p>

livelli di serotonina, glutammato e GABA nello striato dei ratti lesionati e non lesionati, mentre i livelli di dopamina erano ridotti > 90% nello striato lesionato. Alle dosi di 0,16 mg/kg e 0,64 mg/kg, l'F15599 ha prodotto una significativa riduzione dei livelli di 5-HT nello striato intatto e lesionato, mentre i livelli di GABA e glutammato sono rimasti praticamente immutati. I livelli di dopamina hanno subito un leggero aumento alla dose di 0,64 mg/kg nello striato intatto, ma nessuna modifica nello striato lesionato.

EFFETTI DELL'AGONISTA PARZIALE DEI RECETTORI 5-HT_{1A} TANDOSPIRONE

Il tandospirone alle dosi di 0,16 , 0,63 e 2,5 mg/kg + l-DOPA non ha prodotto differenze significative negli AIMs totali e comunque i suoi effetti sono stati completamente antagonizzati dal WAY100635 0,63 mg/kg. Il tandospirone non ha influenzato gli effetti anti-Parkinson della l-DOPA.

“I risultati principali dello studio sono quindi:

- 1) l'attivazione potente e selettiva dei recettori 5-HT_{1A} è sufficiente di per sé a sopprimere gli AIMs indotti dalla l-DOPA nei ratti;
- 2) l'attivazione degli autorecettori 5-HT_{1A} è probabilmente il meccanismo alla base di questa attività antidiscinetica;
- 3) l'attivazione dei recettori 5-HT_{1A} da parte dell'agonista parziale F13714 migliora l'attività dopaminergica nella parte non lesionata del cervello, come indicato dall'aumento delle rotazioni verso la parte ipso-laterale della lesione;
- 4) l'agonista parziale post-sinaptico F15599 sopprime gli AIMs a dosi relativamente alte che attivano gli autorecettori 5-HT_{1A};
- 5) l'agonista clinico dei recettori 5-HT_{1A} , tandospirone, attenua solo leggermente gli AIMs e comunque soltanto alle dosi più alte testate” (Iderberg *et al.*, 2015b).

Tali risultati suggeriscono dunque uno sviluppo di farmaci con queste attività come possibili strategie terapeutiche della LID nei pazienti affetti da Morbo di Parkinson e l'F13714 è il migliore sia per la dose sia per l'effetto nel ridurre i movimenti anomali involontari grazie probabilmente al suo forte agonismo degli autocettori serotoninergici 1A. Non è usato in clinica, ma è sotto studio clinico un suo simile: NLX-112.

L'effetto degli agonisti parziali dei recettori 5-HT_{1A} era già stato studiato su modelli animali di Parkinson prendendo in esame il piclozotan (SUN N4057) alle dosi di 0,018 e 0,036 mg/kg/h somministrate per via sottocutanea per una durata totale dell'esperimento di 20 settimane (Tani *et al.*, 2010). I ratti sono stati lesionati con 6-OHDA e successivamente hanno ricevuto levodopa/benserazide 25/10 mg/kg come induttore di discinesia. Tra la sesta e la nona settimana gli animali hanno ricevuto placebo o piclozotan e tra le ottava e la nona settimana è stata praticata la microdialisi per misurare i livelli di dopamina presenti nello striato dei ratti discinetici. Successivamente sono stati valutati gli effetti comportamentali del trattamento sui ratti.

Il piclozotan alle dosi di 0,018 e 0,036 mg/kg attenua significativamente l'espressione della LID, migliorando i movimenti degli animali con un effetto dose-dipendente e attenua le oscillazioni dei livelli extracellulari di dopamina nello striato degli animali discinetici, suggerendo un suo possibile utilizzo clinico nella cura della discinesia indotta da l-DOPA.

Essendo implicate nella LID sia la dopamina sia la serotonina, è significativo anche l'effetto di un agonista con doppia attività agendo sia sui recettori D₂ sia sui 5-HT_{1A}, SOMCL-171, un analogo dell'apomorfina, che somministrato a ratti discinetici ha dimostrato un'efficace attività antidiscinetica (Zhao *et al.*, 2014). Tale analisi è stata effettuata su ratti maschi Sprague-Dawley a cui è stato indotto il Parkinson tramite somministrazione della neurotossina 6-OHDA e che sono stati

successivamente suddivisi in 4 gruppi così farmacologicamente trattati quotidianamente per 19-21 giorni:

- l-DOPA/benserazide (8/15 mg/kg);
- SOMCL-171 (2 mg/kg);
- SOMCL-171 (2 mg/kg) + l-DOPA/benserazide (8/15 mg/kg);
- Placebo.

Gli AIMs totali sono stati valutati nei giorni 1,3, 6, 9, 10, 13, 16, 19.

Un secondo esperimento è stato condotto su ratti lesionati con 6-OHDA e trattati con l-DOPA per 21 giorni per verificare gli effetti del SOMCL-171 in acuto sulla LID. Gli animali hanno ricevuto SOMCL-171 alle dosi di 1 mg/kg, 2mg/kg o 5 mg/kg oppure placebo 30 minuti prima della somministrazione di l-DOPA.

Tutti i ratti hanno ricevuto il WAY100635 per valutare il ruolo dei recettori serotoninergici 1A nell'attività anti-LID del SOMCL-171.

La co-somministrazione di SOMCL-171 e l-DOPA ha mostrato una minore gravità della LID negli animali trattati rispetto al gruppo che ha ricevuto soltanto la l-DOPA e un significativo ritardo nell'insorgenza della discinesia. Il trattamento cronico con SOMCL-171 ha dunque attenuato la LID come mostrato dalla valutazione degli AIMs totali senza intaccare l'attività anti-Parkinson della levodopa.

Per quanto riguarda la somministrazione in acuto di SOMCL-171, il risultato è stato un affievolimento della LID e un alleviamento dei suoi sintomi.

Analizzando i livelli di mRNA dei recettori striatali D_1 e D_2 , dei recettori dopaminergici 1A e dei trasportatori di dopamina e serotonina in conseguenza alla somministrazione cronica di SOMCL-171, l'espressione di mRNA dei recettori striatali D_1 era downregolata dopo la lesione con 6-OHDA e non ha subito modifiche con SOMCL-171, mentre l'espressione di mRNA dei recettori 5-HT_{1A}, che era molto ridotta nello striato dei ratti

lesionati, è stata riportata a valori normali con SOMCL-171. I livelli di mRNA dei recettori D₂ non erano invece diversi nello striato dei ratti sani o lesionati, così come i livelli di mRNA del trasportatore di dopamina (DAT). I livelli di mRNA del trasportatore della serotonina (SERT) erano invece ridotti nello striato lesionato in tutti i gruppi con o senza il trattamento di l-DOPA o SOMCL-171.

L'agonista SOMCL-171 migliora la LID e ne rallenta lo sviluppo senza modificare l'attività anti-Parkinson della l-DOPA e il suo meccanismo è dovuto all'attività di agonista dei recettori 5-HT_{1A} producendo up-regulation di tali recettori e può essere una buona strategia terapeutica della LID e del Parkinson.

L'agonista dei recettori 5-HT_{1A/1B}, amipirtolina, è stato studiato su modelli parkinsoniani con LID di ratti e macachi e ne è risultata una riduzione dose-dipendente della LID (Bezard *et al.*, 2013). Ratti femmine Sprague-Dawley sono stati trattati con 6-OHDA e l-DOPA/benserazide (6/10 mg/kg) allo scopo di indurre Parkinson e discinesia indotta da l-DOPA e successivamente sono stati suddivisi in quattro gruppi che ricevevano l-DOPA da sola o in combinazione con 3 differenti dosi di amipirtolina: 0,1, 0,5 o 2 mg/kg.

5 scimmie femmine *Macaca fascicularis* sono state lesionate con MPTP allo scopo di indurre il Parkinson e hanno poi ricevuto l-DOPA per sviluppare la LID. La levodopa è stata somministrata oralmente mentre la amipirtolina per via sottocutanea secondo le seguenti modalità:

- l-DOPA/carbidopa + veicolo;
- l-DOPA/carbidopa + amipirtolina (0,15, 0,45, 0,75, 1,5 o 2 mg/kg).

L'amipirtolina sui ratti è stata in grado di ridurre in modo dose-dipendente la LID che è stata annullata quasi completamente dalla dose più alta somministrata di 2 mg/kg che ha ridotto gli AIMs totali di circa il 90%

senza influenzare l'attività della levodopa di migliorare i sintomi motori del Parkinson.

Sulle scimmie, l'anpirtolina ha ridotto in modo dose-dipendente la LID con un annullamento quasi totale alle dosi più alte di 1,5 e 2 mg/kg ma a queste dosi ha prodotto un peggioramento dell'attività anti-Parkinson della levodopa.

Tali risultati confermano il ruolo chiave giocato dalla serotonina nello sviluppo della discinesia indotta da l-DOPA.

Inoltre i recettori serotoninergici 1A e 1B, essendo collocati anche in posizione post-sinaptica nei neuroni striatali della corteccia, controllano anche il rilascio di glutammato e GABA.

Bersagliare tali recettori è un meccanismo che può essere sfruttato come strategia terapeutica della LID ma bisogna tener conto del rapporto rischio/beneficio dei farmaci poiché non deve essere compromessa la qualità di vita del paziente e quindi non deve essere intaccato l'effetto anti-Parkinson della levodopa.

Un'altra valida alternativa nella terapia della LID sarebbe la somministrazione del precursore della serotonina, 5-idrossi-triptofano (5-HTP), che ritarda lo sviluppo della discinesia nei modelli animali di Parkinson (Tronci *et al.*, 2013). I ratti Sprague-Dawley sono stati lesionati con 6-OHDA e trattati dopo 3 settimane dalla lesione nelle seguenti modalità:

- somministrazione cronica di l-DOPA/benserazide (6/6 mg/kg) per 4 settimane allo scopo di sviluppare la LID e in seguito i ratti sono stati divisi in gruppi e trattati in acuto con l-DOPA da sola o in associazione a 5-HTP alle dosi di 6,12, 24 o 48 mg/kg 20 minuti prima della levodopa. I ratti sono stati anche trattati con gli antagonisti dei recettori serotoninergici WAY100635 e SB224289 per verificare l'effetto del 5-HTP.

- Somministrazione giornaliera con l-DOPA/benserazide da sola o in combinazione a 5-HTP alle dosi di 24 o 48 mg/kg o con eltoprazina (agonista 1A e 1B) 0,3 mg/kg o con soluzione salina.

Lo studio ha dimostrato che la somministrazione del precursore della serotonina, 5-HTP, può significativamente ridurre alle dosi di 24 e 48 mg/kg la discinesia di circa il 50% tramite l'attivazione dei recettori 5-HT₁. La sua azione non sembra essere dovuta a una competizione con la l-DOPA nell'attraversamento della barriera emato-encefalica in quanto i livelli striatali di l-DOPA sono simili sia se somministrata da sola che in associazione con il 5-idrossi-triptofano.

Poiché precedentemente si è visto che il glutammato è fortemente implicato nei meccanismi alla base della discinesia indotta da l-DOPA, è possibile sfruttare un trattamento combinato di due farmaci: uno modulatore negativo del recettore del glutammato mGluR5 e uno che modula positivamente il recettore della serotonina 5-HT_{1A/1B} (Iderberg *et al.*, 2013). Il modulatore dei recettori del glutammato è l'MTEP, mentre quello per i recettori serotoninergici è l'8-OH-DPAT/CP94253. Le due molecole sono studiate su modelli parkinsoniani di ratti con discinesia indotta da l-DOPA/benserazide o dall'agonista dopaminergico SKF38393. 12 ratti Sprague-Dawley hanno ricevuto un trattamento cronico giornaliero con l-DOPA/benserazide (10/12 mg/kg) per 3 settimane e successivamente sono stati suddivisi in gruppi trattati con:

- veicolo;
- MTEP 2,5 mg/kg;
- MTEP 5 mg/kg;
- CP94253 0,75 mg/kg + 8-OH-DPAT 0,035 mg/kg;
- CP94253 1,0 mg/kg + 8-OH-DPAT 0,05 mg/kg;
- MTEP 2,5 mg/kg + CP94253 0,75 mg/kg + 8-OH-DPAT 0,035 mg/kg;

- MTEP 5 mg/kg + CP94253 1,0 mg/kg + 8-OH-DPAT 0,05 mg/kg.

Altri 12 ratti Spargue-Dawley hanno ricevuto trattamento cronico giornaliero con SKF38393 (2,5 mg/kg) per 3 settimane e in seguito sono stati suddivisi in gruppi random così trattati:

- Veicolo;
- MTEP 2,5 mg/kg;
- MTEP 5 mg/kg;
- CP94253 0,75 mg/kg + 8-OH-DPAT 0,035 mg/kg;
- CP94253 1,0 mg/kg + 8-OH-DPAT 0,05 mg/kg;
- MTEP 2,5 mg/kg + CP94253 0,75 mg/kg + 8-OH-DPAT 0,035 mg/kg;
- MTEP 5 mg/kg + CP94253 1,0 mg/kg + 8-OH-DPAT 0,05 mg/kg.

5 mg/kg di MTEP e 0,05/1 mg/kg di 8-OH-DPAT/CP94253 hanno ridotto significativamente gli AIMs totali indotti dalla l-DOPA e le due molecole hanno avuto effetto maggiore se somministrate in associazione piuttosto che da sole di fatti l'MTEP 2,5 mg/kg e l' 8-OH-DPAT/CP94253 che da soli non avevano effetto, hanno attenuato i sintomi della LID se somministrati insieme.

MTEP 2,5 mg/kg e 5 mg/kg ha ridotto la discinesia indotta dall'agonista dopaminergico SKF38393, mentre l'8-OH-DPAT/CP94253 non ha avuto effetto su questa discinesia.

La combinazione tra un modulatore negativo del mGluR5 e un modulatore positivo dei recettori serotoninergici 1A e 1B, può quindi dare un sinergismo sul trattamento della LID permettendo una riduzione delle dosi dei due farmaci se in associazione e di conseguenza una minore frequenza di sviluppo di effetti indesiderati.

Questo sinergismo comunque non si è verificato nei ratti con discinesia indotta dall'agonista dopaminergico.

Riporto ora i risultati di uno studio clinico a doppio cieco volto a definire la dose ottimale di eltoprazina, un agonista dei recettori serotoninergici 5-HT_{1A/1B}, per contrastare la LID in un gruppo di 22 pazienti affetti da Morbo di Parkinson e trattati con Sinemet ® (Svenningsson *et al.*, 2015) confrontati con un gruppo trattato con placebo.

I pazienti hanno ricevuto capsule di 2,5, 5 o 7,5 mg di eltoprazina o placebo.

Le scale di misura utilizzate sono state: la CDRS (Clinical Dyskinesia Rating Scale) AUC per calcolare l'area sotto la curva della discinesia 3 ore dopo la somministrazione dei farmaci, la RDRS (Rush Dyskinesia Rating Scale) e la UPDRS III (Unified Parkinson's Disease Rating Scale parte III). I pazienti sono stati visitati 5 volte dopo la ricezione di ognuno dei diversi trattamenti e ogni volta ricevevano anche dosi subliminari di l-DOPA. Un gruppo di 12 pazienti è stato anche preso come campione per verificare le concentrazioni plasmatiche di eltoprazina.

La eltoprazina somministrata alle dosi di 5 mg ha causato una riduzione significativa della LID come misurato dalle scale CDRS e RDRS e le analisi farmacocinetiche hanno mostrato un tempo di picco delle concentrazioni plasmatiche compreso fra le 2 e le 4 ore dalla somministrazione e dipendente dalla dose.

Le reazioni avverse più frequenti sono state vertigini e nausea.

Il trattamento con una singola dose orale di eltoprazina ha un buon effetto antidiscinetico senza alterare l'attività anti-Parkinson della l-DOPA, in generale tutte le dosi di eltoprazina sono ben tollerate e il farmaco ha un favorevole rapporto rischio/beneficio e profilo farmacocinetico, suggerendo un suo vantaggioso uso clinico nel trattamento della discinesia indotta da l-DOPA nel Morbo di Parkinson.

Come possibili strategie terapeutiche nella LID si può quindi intervenire su delle sottopopolazioni dei recettori 5-HT_{1A}:

1. con farmaci specifici che quindi diminuiscano la comparsa di reazioni avverse
2. stimolando sia i recettori sia post sia pre-sinaptici per diminuire la trasmissione serotoninergica
3. utilizzando agonisti dei recettori 1A e 1B che in associazioni diano un'attività sinergica permettendo una diminuzione delle dosi e di effetti collaterali.

4.6.2 I recettori serotoninergici 5-HT₂

I recettori serotoninergici 5-HT₂ comprendono i sottotipi A, B e C e sono recettori metabotropici accoppiati a proteine G_q (attivano le fosfolipasi). Questo tipo di recettori è allo studio come bersaglio di farmaci nella terapia della LID.

Valutando i livelli del recettore 5-HT_{2A} in scimmie lesionate con MPTP e trattate con l-DOPA allo scopo di renderle discinetiche con o senza aggiunta di farmaci che inibiscano l'espressione della LID: Cl-1041 (antagonista dei recettori NMDA) e Cabergolina (agonista dei recettori D₂ a lunga durata d'azione), ne è risultato che i livelli di ketanserina (sostanza che si lega in modo specifico ai recettori 5-HT_{2A}) erano aumentati nelle scimmie discinetiche paragonate a quelle non discinetiche e al gruppo di controllo, indicando un aumento dei livelli dei recettori 2A nella LID (Riahi *et al.*, 2011).

In uno studio preclinico è stata studiata l'attività della quetiapina, antipsicotico atipico antagonista dei recettori 5-HT_{2A/2C} e D_{2/3}, nell'attenuare le complicazioni motorie della discinesia indotta da l-DOPA in modelli animali (Oh *et al.*, 2002).

Lo studio è stato condotto su ratti lesionati con 6-OHDA e scimmie lesionate con MPTP che sono stati trattati con quetiapina da sola o in associazione alla levodopa.

Il risultato è stato che alle dosi di 5 mg/kg la quetiapina co-somministrata con la levodopa riduce in modo significativo la discinesia indotta da l-DOPA suggerendo un suo potenziale effetto terapeutico sulle complicanze motorie indotta dalla terapia con levodopa nel Morbo di Parkinson e confermando anche il ruolo dei recettori serotoninergici tipo 2 nella patogenesi della LID.

Un potente agonista inverso e antagonista dei recettori 5-HT_{2A}, ACP-103, è stato analizzando per valutare la sua capacità di ridurre i sintomi della discinesia indotta da l-DOPA in modelli parkinsoniani di scimmie lesionate con la neurotossina MPTP (Vanover *et al.*, 2008). Le scimmie, in seguito alla somministrazione di MPTP, hanno ricevuto dosi subcutanee di levodopa fino all'insorgenza di un certo grado di discinesia, dopodichè sono state trattate con soluzione salina o con ACP-103 a dosi differenti da solo o in associazione alla l-DOPA, testando i farmaci in gruppi scelti in modo casuale. I sintomi del parkinson e il livello della gravità di discinesia sono stati valutati con la scala di Laval per i movimenti involontari e le disabilità motorie.

Se somministrato in associazione alla levodopa, l'ACP-103 ha causato una riduzione dose-dipendente della discinesia: la dose più bassa di 0,6 mg/kg ha prodotto una riduzione della discinesia di circa il 12%, la dose intermedia di 1,2 mg/kg ha portato a una riduzione del 26%, mentre la dose

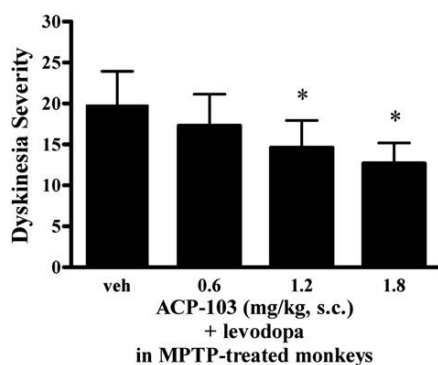


Figura 5. Riduzione della gravità della discinesia con la somministrazione di veicolo e con l'associazione di ACP-103 alla l-DOPA.

Fonte: Vanover, K.E., Betz, A.J., Weber, S.M., Bibbiani, F., Kielaite, A., Weiner, D.M., Davis, R.E., Chase, T.N., Salamone, J.D., 2008. A 5-HT_{2A} receptor inverse agonist, ACP-103, reduces tremor in a rat model and levodopa-induced dyskinesias in a monkey model. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 90, 540-544.

più alta di 1,8 mg/kg ha ridotto i sintomi della discinesia del 36 %. La gravità della discinesia è stata ridotta in modo più significativo dalla dose di 1,8 mg/kg (**Figura 5.**)

I vantaggi dell'ACP-103 sono che sia da solo sia in associazione con la l-DOPA non ha influenzato la risposta anti-Parkinson alla levodopa e non ha dato origine a particolari effetti collaterali come sonnolenza, atassia o altri effetti comportamentali.

La spiegazione di questo suo effetto è probabilmente dovuta al fatto che, poiché in condizioni di deplezione di dopamina le vie di signaling derivate dal recettore serotoninergico 2A sono più forti nello striato, un antagonismo di questi recettori frena l'attività della serotonina e il conseguente rilascio della dopamina dai suoi terminali nervosi che si è visto causare stimolazione pulsatile dei recettori dopaminergici con conseguente sviluppo della LID.

Sono stati effettuati anche diversi trials clinici che analizzando il coinvolgimento dei recettori serotoninergici nella LID e di conseguenza la loro potenzialità come bersagli dei farmaci antidiscinetici.

L'aripirazolo è un farmaco antipsicotico caratterizzato da agonismo parziale nei confronti dei recettori D₂ e 5-HT_{1A} e antagonismo dei recettori 5-HT_{2A}, perciò valutandolo per un anno su pazienti parkinsoniani con discinesia indotta da l-DOPA, è stato possibile osservare che a dosi molto basse, in quanto non sono tollerate dosi più alte, mostra una buona efficacia nel trattamento della LID (Meco *et al.*, 2009).

Per lo studio sono stati arruolati 12 pazienti con Morbo di Parkinson diagnosticato secondo i criteri della United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank. I pazienti inoltre dovevano aver sviluppato discinesia da dose di picco e dovevano essere in cura o aver precedentemente assunto amantadina senza benefici terapeutici.

Tutti i 12 pazienti sono stati trattati con aripiprazolo 0,625 mg una volta al giorno, la sera e sono stati valutati sempre dalla stessa persona e nello stesso momento del giorno nei mesi 1,2,3,6,8,10 e 12.

2 pazienti hanno abbandonato il trial nel primo mese e dopo 8 mesi a causa di un peggioramento dei sintomi del Parkinson, mentre un paziente ha voluto continuare il trattamento sebbene i suoi sintomi parkinsoniani stessero peggiorando.

I 10 pazienti rimasti fino alla fine dello studio, hanno mostrato una significativa diminuzione dell'intensità e della frequenza della discinesia in tutte le parti del corpo e dopo il primo mese dello studio è stata osservata una completa diminuzione delle discinesie in 4 dei 10 pazienti che è durata per tutto l'anno del trattamento.

La dose tollerata di aripiprazolo è quindi molto bassa, 0,625 mg, ma permette una efficace riduzione della LID, sebbene lo studio dovrebbe essere ripetuto su un numero maggiore di pazienti per avere dati più precisi. L'agonista inverso dei recettori 5-HT_{2A}, di cui ho descritto sopra uno studio preclinico, ha mostrato di alleviare la discinesia anche in trials clinici (Roberts, 2006).

Uno studio a doppio cieco, controllato da placebo, è stato condotto su 50 pazienti con Morbo di Parkinson in stadio avanzato e con discinesia indotta da l-DOPA per valutare l'efficacia della clozapina, farmaco antipsicotico antagonista dei recettori D_{1/4} e 5-HT₂, nel trattamento della LID (Durif *et al.*, 2004). Tale studio ha avuto una durata di 10 settimane e i pazienti hanno ricevuto un trattamento in acuto di levodopa all'inizio e alla fine dello studio, mentre la clozapina è stata loro somministrata durante tutto il periodo. Nel gruppo trattato con clozapina si è osservato una riduzione della durata della LID se paragonato con il gruppo che ha ricevuto il placebo. Lo studio è stato abbandonato da un totale di 12 pazienti: 5 del gruppo trattato con clozapina e 7 del gruppo placebo, per insorgenza di

reazioni avverse. Dei 5 pazienti del gruppo trattato con clozapina, 3 hanno sviluppato eosinofilia che è stata rapidamente risolta con il dechallenge del farmaco. La clozapina risulta quindi efficace nel trattamento clinico della discinesia indotta da l-DOPA nel Morbo di Parkinson.

Così come per i recettori 5-HT₁, sono richiesti studi su farmaci più selettivi per un particolare sottotipo recettoriali dei recettori serotoninergici tipo 2 per ridurre le reazioni avverse e nel contempo determinare una buona efficacia nel trattamento della LID.

4.6.3 Il trasportatore della serotonina (SERT)

La serotonina, una volta che è stata rilasciata nel vallo sinaptico, subisce un meccanismo di reuptake ad opera del suo trasportatore specifico: SERT. Tale trasportatore si ipotizza possa essere implicato nei meccanismi della LID in quanto modula la trasmissione serotoninergica che si è visto essere di grande importanza nella discinesia indotta da l-DOPA.

Dal punto di vista clinico, si è studiato il potenziale effetto di farmaci inibitori del reuptake della serotonina, SSRI, sullo sviluppo della discinesia in pazienti con Morbo di Parkinson.

Uno studio clinico recente, sviluppato a Pisa, ha arruolato 135 pazienti con Morbo di Parkinson diagnosticato secondo i criteri della UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Criteria (Mazzucchi *et al.*, 2014). La dose massima giornaliera di levodopa che questi pazienti assumevano era espressa come dose equivalente di levodopa (LED) in quanto teneva in considerazione sia la l-DOPA, sia gli inibitori delle MAO e delle COMT. L'utilizzo degli SSRI da parte dei pazienti durante o prima del trattamento con la levodopa ha fatto sì che fossero divisi in due gruppi:

- S+ : trattati con gli SSRI per periodi variabili (farmaci: sertralina, fluoxetina, paroxetina, citalopram ed escitalopram);

- S- : mai trattati con gli SSRI+ o con farmaci antidepressivi.

49 pazienti hanno ricevuto gli SSRI per un periodo variabile, mentre 86 pazienti non sono mai stati trattati con gli SSRI.

Lo studio ha rivelato che l'utilizzo degli SSRI non è un trattamento di prevenzione per lo sviluppo della LID, ma ne ritarda efficacemente l'inizio e ne modula la gravità.

Numerosi studi preclinici sono stati effettuati su animali parkinsoniani per valutare l'efficacia degli SSRI nel trattamento della discinesia indotta da l-DOPA che hanno prodotto ulteriori prove del coinvolgimento della serotonina nella LID.

Uno studio del 2012 (Bishop *et al.*, 2012) ha analizzato gli inibitori del reuptake della serotonina nel trattamento della LID in due esperimenti separati su ratti emi-parkinsoniani e resi discinetici con somministrazione costante di l-DOPA.

La somministrazione acuta di citalopram, paroxetina e fluoxetina è un potenziale approccio nella terapia della LID in quanto produce effetti antidiscinetici, dose-dipendenti, senza alterare l'efficacia della l-DOPA nella cura del Morbo di Parkinson. La discinesia indotta dal farmaco dopaminergico apomorfina non è stata influenzata dalla somministrazione degli inibitori del SERT.

A questo proposito è interessante uno studio condotto sui ratti che ipotizzava una correlazione dei livelli di ansia con lo sviluppo della discinesia indotta da l-DOPA poiché era stato osservato che, animali geneticamente uguali, ma abituati a un diverso contesto ambientale sviluppano con gravità diversa la LID (Kuan *et al.*, 2008). I ratti Sprague-Dawley avevano Parkinson indotto dalla lesione con 6-OHDA e LID e sono stati trattati con l'inibitore del SERT, citalopram. Essi sono stati suddivisi in gruppi in base al grado di ansietà e in base al trattamento ricevuto.

Osservando i movimenti anomali involontari, ne è risultato che il trattamento cronico con citalopram ha condotto a una riduzione dei sintomi della LID, ma non è stata dimostrata nessuna correlazione tra la LID e il grado di ansietà (misurato come livello di corticosterone e con i test EPM e OF) degli animali. Si è però osservato che il grado di ansietà era inversamente correlato alla capacità del citalopram di migliorare la LID.

Nello striato, i livelli del recettore 5-HT_{1B} sono stati diminuiti dalla somministrazione di citalopram, mentre non è stata influenzata l'espressione e la fosforilazione del sistema CdK5/DARPP-32.

Il trattamento con gli SSRI può quindi essere una attuabile strategia terapeutica della discinesia indotta da l-DOPA poiché in generale producono una valida riduzione della LID senza alterare l'effetto anti-Parkinson della levodopa.

4.7 Il sistema GABAergico

Il GABA (acido γ -amminobutirrico) è sintetizzato a partire dal glutammato tramite l'azione dell'enzima GAD (decarbossilasi dell'acido glutammico) ed è il neurotrasmettitore inibitorio principale nel sistema nervoso centrale. Agisce sui suoi recettori GABA_A e GABA_B : i primi si trovano principalmente nel sistema nervoso centrale e sono canali ionici permeabili al cloro, i secondi sono recettori metabotropici accoppiati a proteine G e si ritrovano anch'essi nel cervello (Huot *et al.*, 2013a).

Come precedentemente descritto, il GABA gioca un ruolo molto importante nei gangli della base.

Una diminuzione dell'eccitazione della corteccia e quindi un miglioramento della LID potrebbe essere causato, ad esempio, da un'inibizione delle vie talamocorticali grazie a un potenziamento della trasmissione GABAergica che va dal globus pallidus interno e dalla substantia nigra pars reticulata al talamo (Huot *et al.*, 2013a).

Per quanto riguarda gli studi preclinici, sono stati trovati aumentati livelli dei recettori GABA_A nel globus pallidus interno di scimmie lesionate con MPTP e questa up-regulation recettoriale era correlata allo sviluppo di discinesie indotte da levodopa o da agonisti dopaminergici, mentre non sono state trovati aumenti significativi dei recettori GABA_B nel globus pallidus interno di scimmie discinetiche trattate con MPTP; gli studi clinici hanno osservato un aumento dei livelli del recettore GABA_A nella parte ventrale del globus pallidus interno in pazienti parkinsoniani con discinesia indotta da l-DOPA (Calon and Di Paolo, 2002).

“ In campioni post mortem di pazienti parkinsoniani trattati con levodopa, sono stati trovati aumentati l'espressione della PPE-A nel putamen e il contenuto di recettori GABA_A nel globus pallidus interno nei pazienti discinetici paragonati ai pazienti non discinetici” (Calon and Di Paolo, 2002).

Clinicamente è stata studiata l'efficacia dell'inibitore della GABA transaminasi, gamma vinil GABA (GVG), nel trattamento della discinesia indotta da l-DOPA su 5 pazienti affetti da Morbo di Parkinson con LID, di età compresa tra il 41 e i 74 anni e trattati con levodopa in media da 9 anni e con dosaggi compresi tra i 450 e i 1400 mg/giorno (Turjanski and Lees, 1992). Questi pazienti hanno ricevuto 2 Gm/giorno di GVG per una settimana e 3 Gm/giorno nella seconda settimana.

Valutando la discinesia con scale appropriate e con diari personali dei pazienti compilati per 3 giorni a settimana, ne è risultato che il GVG ha aggravato i sintomi del Parkinson senza alleviare in modo significativo la LID.

È stato rivolto un particolare interesse anche al farmaco ipnotico, non bendodiazepinico, zolpidem, che agisce come un agonista selettivo del recettore GABA_A. Era già stato dimostrato che a dosi subipnotiche, 2,5-5 mg, è in grado di opporsi allo sviluppo della discinesia indotta da l-DOPA

(Ruzicka *et al.*, 2000), tale ipotesi è stata ulteriormente confermata da uno studio condotto su un pazienti parkinsoniano di 53 con uno stadio avanzato della malattia a cui è stato somministrato lo zolpidem alle dosi di 10 mg che ha prodotto un miglioramento dei sintomi motori del 27% secondo la scala UPDRS-III (Chen *et al.*, 2008). La discinesia è alleviata in modo significativo da 10 mg di zolpidem e l'effetto dura per mezza giornata. I siti di legame per lo zolpidem sono maggiormente presenti nel globus pallidus interno e nella pars reticulata della substantia nigra suggerendo quindi un coinvolgimento del GABA nelle strutture di output che sono punti cruciali nei meccanismi che stanno alla base della LID.

L'anticonvulsivante zonisamide ha mostrato, in uno studio clinico a doppio cieco condotto su pazienti parkinsoniani, di avere una buona efficacia nel trattamento del Parkinson alle dosi 25 e 100 mg/giorno senza aumentare la discinesia (Murata *et al.*, 2007).

Il ruolo del GABA nella discinesia indotta da l-DOPA è stato analizzato con tecniche auto-radiografiche utilizzando il flunitrazepam come marcatore dei siti di legame benzodiazepinici dei recettori GABA_A e il TBPS (t-butylicyclophosphorothionate) come marcatore dei canali al cloro dei recettori GABA_A nella parte reticulata della substantia nigra e nel nucleo subtalamico (Samadi *et al.*, 2008). Alcune scimmie parkinsoniane su cui è stato condotto l'esperimento avevano sviluppato la LID, mentre in altre l'insorgenza della discinesia è stata prevenuta dalla somministrazione del CL-1041, antagonista selettivo dei recettori per il glutammato NR1A/2B, o di cabergolina a basse dosi, agonista dei recettori D₂. I livelli recettoriali del GABA_A sono risultati diminuiti nella parte reticolata della substantia nigra negli animali discinetici paragonati a quelli non discinetici. Recentemente è stato osservato che la formula composta della Rehmannia, secondo la medicina tradizionale cinese, è in grado di aumentare i livelli

dei recettori GABA_B se somministrata a animali discinetici (Teng *et al.*, 2014).

Si può dunque concludere che poiché il GABA gioca un ruolo cruciale nella regolazione dell'eccitazione neuronale al livello dei gangli della base, un suo blocco porta a un aumento incontrollato dell'eccitabilità neuronale. Un potenziamento dell'attività del GABA può essere una valida strategia terapeutica per la LID poiché permette di ristabilire il controllo sulle strutture di output dei gangli della base e quindi sull'eccitabilità delle vie talamo-corticali, conducendo a un miglioramento dei sintomi motori della discinesia. I farmaci studiati a questo proposito presentano una bassa frequenza di eventi avversi, come la sedazione e lo sviluppo di tolleranza tipici delle benzodiazepine, e non devono peggiorare la qualità di vita dei pazienti con Morbo di Parkinson.

4.8 Il sistema adenosinico

L'adenosina è un neurotrasmettitore purinergico inibitorio che esplica la sua azione tramite quattro tipi di ricettori: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Tutti e quattro i tipi recettoriali sono accoppiati a proteine G: i tipi 1 e 3 si accoppiano a proteine G_i, mentre il tipo 2 si accoppia a proteine G_s.

Il recettore tipo 1 si ritrova nell'ippocampo, nella corteccia e nei neuroni striatali della via diretta e della via indiretta, il recettore tipo 2A è espresso lungo la via indiretta e può formare eterodimeri con i recettori D₂ e mGlu5, modulando quindi la trasmissione glutammatergica e dopaminergica.

L'attivazione dei recettori 2A inibisce il rilascio di GABA dal globus pallidus conseguente all'attivazione dei recettori D₂ e stimola l'adenilato ciclasi con conseguente aumento dei livelli di Gαolf e cAMP, si ha quindi attivazione della trasduzione del segnale a valle che contribuisce allo sviluppo della LID (Sharma *et al.*, 2015). I recettori A₁ sono co-espressi

con i recettori D_1 sui neuroni striatali che proiettano verso la pars reticulata della substantia nigra e verso il globus pallidus mediale, mentre i recettori A_{2A} sono co-espressi con i recettori D_2 sui neuroni striatali che proiettano verso il globus pallidus laterale, risulta evidente che il sistema dopaminergico e quello adenosinico sono in stretta correlazione a livelli dei gangli della base e l'adenosina modula la risposta dei neuroni striatali alla stimolazione dopaminergica, contrastando l'effetto della dopamina (Blandini, 2003).

È stato di conseguenza ipotizzato che un antagonismo dei recettori A_{2A} possa potenziare l'attività e l'efficacia della levodopa e nel contempo ridurre la sua azione pro-discinetica.

Antagonizzare il recettore tipo 2A può esercitare un effetto preventivo nei confronti della LID, di fatti sono state studiate due molecole antagoniste di tale recettore, KW-6002 (o istradefillina) e SCH58261 su ratti con lesione unilaterale provocata dalla neurotossina 6-OHDA (Xiao *et al.*, 2006). Trattando quotidianamente i ratti discinetici con KW-6002 intraperitoneale co-somministrato a 2 mg/kg di levodopa per 3 settimane, ne è risultato che alla dose di 0.03 mg/kg i movimenti anomali rotazionali indotti dalla l-DOPA sono stati parzialmente bloccati e anche alla dose di 0,3 mg/kg si ha un'attenuazione dello sviluppo della LID. I ratti trattati con l'antagonista dei recettori A_{2A} SCH58261 a dosi di 0,03 mg/kg hanno sperimentato un'attenuazione dei movimenti involontari indotti dalla l-DOPA e ripetendo l'esperimento, somministrando l'SCH58261 venti minuti prima di ogni somministrazione della levodopa, l'antagonista dei recettori adenosinici 2A ha potenziato significativamente la risposta in acuto al trattamento con l-DOPA, ma ha anche ridotto i movimenti involontari in modo statisticamente significativo. Nei ratti in cui è stata applicata una deplezione dei recettori A_{2A} si è osservata una diminuzione dei movimenti anomali involontari indotti dalla l-DOPA.

Si conclude quindi che un antagonismo dei recettori adenosinici tipo 2A può essere preventivo nei confronti dello sviluppo della LID nei pazienti con Morbo di Parkinson. Il KW-6602, se utilizzato in monoterapia, sembra avere una buona efficacia nel controllo dei sintomi motori parkinsoniani senza avere potenziale discinetico, mentre se somministrato in associazione con la l-DOPA potenzia l'effetto anti-Parkinson di quest'ultima ma non ne modifica la capacità di indurre discinesia (Lundblad *et al.*, 2003).

La istradefillina è stata somministrata a uistiti (*Callithrix jacchus*) [resi parkinsoniani con la neurotossina MPTP e discinetici tramite un trattamento di 28 giorni con l-DOPA/benserazide (10/2,5 mg/kg)] per valutare la capacità del farmaco di indurre discinesia alla dose singola di 10 mg/kg (Uchida *et al.*, 2014). Lo studio ha analizzato gli effetti della istradefillina (10 mg/kg) quando somministrata in dose unica con o senza l-DOPA (2,5 mg/kg + benserazide 0,625 mg/kg) disabilità motorie e sull'attività locomotrice negli uistiti discinetici. La co-somministrazione della istradefillina con la l-DOPA ha potenziato l'attività anti-Parkinson e la durata d'azione di quest'ultima, e il trattamento cronico combinato dei due farmaci non ha potenziato la discinesia, anzi il trattamento continuato con la istradefillina ha ridotto la gravità della discinesia indotta dalla l-DOPA, senza opporsi al priming.

La istradefillina quindi potrebbe essere aggiunta in combinazione al trattamento con la levodopa nei pazienti parkinsoniani poiché dati i suoi effetti positivi sull'attività motoria permetterebbe una riduzione dei dosaggi di l-DOPA necessari e di conseguenza una riduzione degli effetti avversi ad essa correlati, come la discinesia.

Risultati simili derivano anche da uno studio condotto su modelli di ratti parkinsoniani discinetici, in cui la somministrazione cronica (19-22 giorni) di molecole antagoniste dei recettori A_{2A} : SCH 412348 (3 mg/kg), vipadenant (10 mg/kg), caffeina (30 mg/kg) o istradefillina (3 mg/kg) sugli

animali precedentemente trattati con la l-DOPA non ha prodotto discinesia, mentre se le quattro molecole venivano somministrate in concomitanza alla levodopa l'insorgenza non veniva bloccata, ma nemmeno peggiorata (Jones *et al.*, 2013).

Si pensa che il blocco dei recettori A_1 localizzati sui neuroni striatonigrali della via diretta possa facilitare l'attività motoria disinibendo l'azione dei recettori D_1 e il blocco degli A_{2A} sui neuroni striatopallidali della via indiretta possa produrre una stimolazione dei recettori D_2 , perciò è stata studiata l'efficacia di un antagonismo contemporaneo dei recettori A_1 e A_{2A} (Xiao *et al.*, 2011). Per valutare ciò, sono stati utilizzati topi emiparkinsoniani, lesionati con 6-OHDA, e trattati quotidianamente con l-DOPA per 3 settimane, che sono stati privati dei recettori A_1 o A_{2A} oppure sia A_1 sia A_{2A} . Il coinvolgimento dei recettori adenosinici nella LID è stato studiato, oltre che con modificazioni genetiche, anche con la somministrazione ai topi di un antagonista non specifico della adenosina, caffeina, alle dosi di 15 e 3 mg/kg. Paragonati ai topi che non hanno subito mutazione genica, i movimenti anomali involontari (AIMs) sono risultati significativamente ridotti nei topi con delezione dei recettori 1 o 2A, mentre la riduzione non è stata così evidente nei topi che con delezione doppia dei recettori 1 e 2A.

La somministrazione di caffeina non ha avuto risultati molto chiari sul controllo dei movimenti anomali, lo studio dimostra quindi che per la profilassi della LID occorre indirizzarsi verso un blocco dei recettori 1 o 2A, ma non dei due tipi recettoriali in contemporanea.

L'assunzione, da parte di pazienti parkinsoniani, di caffeina a dosi alte risulta associata a uno sviluppo minore di discinesia rispetto alle dosi più basse, secondo uno studio CALM-PD che confronta gli effetti del pramipexolo e della l-DOPA nell'indurre discinesia in pazienti con Morbo di Parkinson (Jenner, 2013). Non è comunque chiaro se questo effetto della

caffeina è dovuto esclusivamente alla sua capacità di antagonizzare i recettori A_{2A} o se magari esplica la sua funzione modificando il rilascio di glutammato tramite l'occupazione dei recettori A_1 .

Precedentemente era stato osservato che la somministrazione dell'antagonista dei recettori A_{2A} , CSC o 8-(3-chlorostyryl) caffeina, alle dosi di 5 mg/kg al giorno in ratti lesionati con 6-OHDA e trattati con 50 mg/kg al giorno di levodopa ha portato a una riduzione della discinesia indotta da l-DOPA (Bove *et al.*, 2006).

Negli studi clinici, si è osservato che l'antagonista dei recettori adenosinici $2A$, preladenant, ha migliorato significativamente i sintomi del Parkinson senza produrre discinesia (Hodgson *et al.*, 2010), mentre la istradefillina da una parte potenzia l'attività anti-Parkinson se co-somministrata con una basse dose di l-DOPA producendo meno discinesia rispetto alla levodopa somministrata da sola (Bibbiani *et al.*, 2003) e dall'altra esaspera la gravità della discinesia in studi confrontati con il placebo (Hauser *et al.*, 2008).

4.9 Il sistema cannabinoide

Il sistema cannabinoide è un sistema di grande importanza per l'organismo in quanto regola molte funzioni tra cui controllo e coordinazione del movimento e della postura, mantenimento dell'equilibrio. In tale sistema sono protagoniste molecole endogene chiamate endocannabinoidi che esplicano la loro azione sui recettori cannabinoidi.

4.9.1 I recettori cannabinoidi

I recettori cannabinoidi sono di due tipi: CB_1 e CB_2 e sono entrambi recettori metabotropici accoppiati a proteine G. I CB_1 sono maggiormente

espressi a livello del sistema nervoso e nell'encefalo la loro distribuzione prevalente è nelle aree che controllano la funzionalità motoria, la coordinazione e l'equilibrio; sono molto distribuiti nei gangli della base a livello della substantia nigra e del corpo striato. A livello dei gangli della base si ritrovano anche livelli elevati di anandamide e 2-arachidonil glicerolo (2AG). Nel sistema nervoso centrale modulano il rilascio di alcuni neurotrasmettitori proteggendolo da sovra-stimolazione o sovra-inibizione. I CB₂ si ritrovano principalmente a livello periferico e hanno attività immuno-modulatoria.

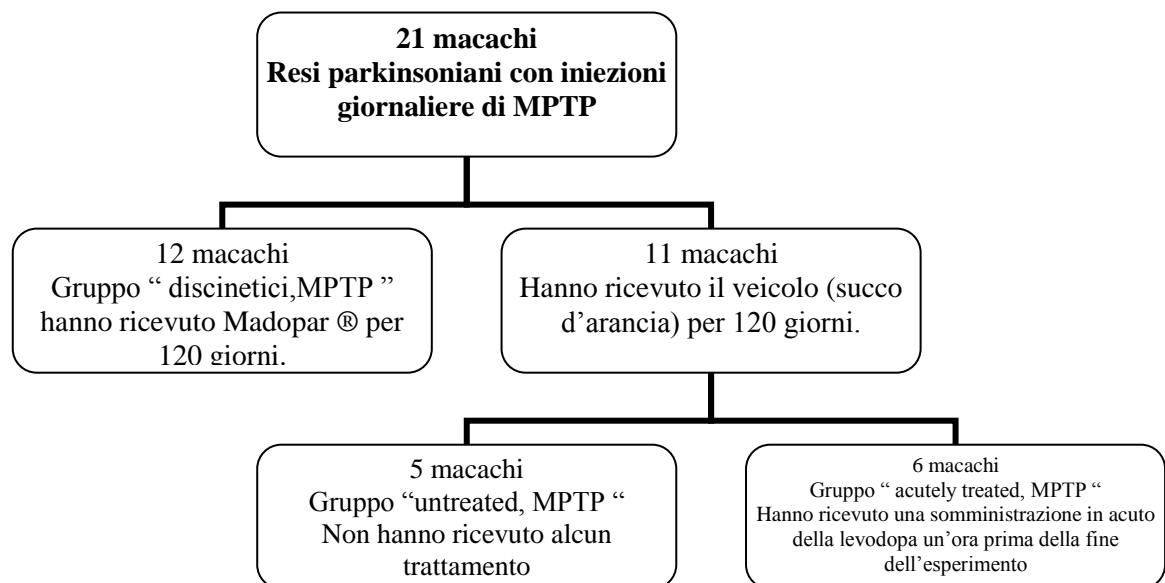
L'attivazione dei recettori cannabinoidi tipo 1 nello striato aumenta la trasmissione GABAergica nel globus pallidus esterno e riduce il rilascio del glutammato, come dimostrato su uistiti parkinsoniani, con discinesia indotta da l-DOPA, a cui è stato somministrato l'agonista cannabinoide nabilone alle dosi di 0,01, 0,03 e 0,10 mg/kg con la levodopa e ne è risultato che alla dose di 0,10 mg/kg ha portato a una riduzione significativa della discinesia totale senza intaccare l'effetto anti-Parkinson della l-DOPA e alla dose intermedia di 0,03 mg/kg di nabilone la durata dell'attività anti-Parkinson della levodopa è stata aumentata del 76% (Fox *et al.*, 2002).

Il nabilone aveva mostrato una buona capacità di ridurre la LID nei pazienti con Morbo di Parkinson anche in uno studio clinico a doppio cieco condotto su pazienti parkinsoniani confrontati con pazienti ricevanti il placebo (Sieradzan *et al.*, 2001).

Sette uistiti (*Callithrix jacchus*) sono stati trattati con MPTP allo scopo di servire come modelli animali di Parkinson e successivamente hanno ricevuto due volte al giorno per 3 settimane il farmaco Madopar® (12,5 mg/kg di l-DOPA + 3,1 mg/kg di benserazide) per produrre una forma stabile di LID; dopodiché hanno ricevuto l'antagonista dei recettori CB₁,

rimonabant, alle dosi di 0,3, 1 e 3 mg/kg come monoterapia o in associazione alla levodopa (van der Stelt *et al.*, 2005).

Il rimonabant somministrato da solo ha prodotto, alle dosi di 1 e 3 mg/kg, un buon controllo dei sintomi del Parkinson, senza generare discinesia, la co-somministrazione di rimonabant e levodopa ha prodotto un grado di discinesia minore di quello prodotto dalla l-DOPA somministrata da sola, senza interferire in modo significativo con l'attività anti-Parkinson della l-DOPA. Questo studio preclinico ha avuto anche una seconda parte, in cui 27 macachi sono stati analizzati per vedere i livelli di endocannabinoidi. 6 macachi non hanno ricevuto alcun trattamento perché rappresentavano il gruppo di controllo, mentre gli altri 21 hanno ricevuto i trattamenti descritti dal seguente diagramma:



I livelli di anandamide erano aumentati del 49% nello striato e del 40% nel globus pallidus esterno nel gruppo “untreated,MPTP” rispetto ai 6 macachi del gruppo di controllo, mentre la somministrazione di levodopa non ha prodotto modifiche rilevanti dei livelli di anandamide.

I livelli del 2-arachidonil glicerolo erano aumentati dell'88% nello striato del gruppo “ untreated, MPTP ” e sono stati normalizzati dalla somministrazione in acuto della levodopa, mentre nel globus pallidus esterno tali livelli erano leggermente diminuiti nel gruppo non trattato e molto ridotti invece nel gruppo discinetico. I livelli di anandamide erano elevati nella substantia nigra dei gruppi discinetici e non trattati.

Il rimonabant riesce quindi a ridurre la LID senza compromettere i sintomi del Parkinson e se somministrato in monoterapia ha una buona efficacia anti-Parkinson, mentre le alterazioni dei livelli di endocannabinoidi non sembrano essere correlati con la gravità della LID.

Si può quindi affermare che sia gli agonisti sia gli antagonisti dei recettori CB₁ possono modulare l'espressione della LID. L'iniezione di rimonabant (0,1-3 mg/kg) riduce i sintomi della discinesia così come la somministrazione dell'agonista del recettore cannabinoide di tipo 1, WIN55,212-2 (1 mg/kg) (Segovia *et al.*, 2003).

La co-somministrazione sistemica di WIN55,212-2 e l-DOPA migliora i movimenti anomali involontari caratteristici della LID in ratti parkinsoniani e diminuisce l'iperattività della proteina chinasi A striatale indotta dalla levodopa, tramite un meccanismo mediato dai recettori CB₁ (Martinez *et al.*, 2012). Questo risultato è importante clinicamente in quanto la gravità della LID risulta essere correlata all'attività della PKA.

È stato ipotizzato che il rimonabant (1 mg/kg) se co-somministrato alla levodopa (30 mg/kg) riesce a diminuire la discinesia indotta da l-DOPA tramite la conservazione di alcune cellule dopaminergiche immunoreattive alla tirosina idrossilasi arrestando quindi la degenerazione delle cellule del corpo striato e della substantia nigra (Gutierrez-Valdez *et al.*, 2013).

L'importanza di farmaci che agiscono sul sistema cannabinoide per quanto riguarda la LID risiede anche nel fatto che se non influenzano o migliorano l'attività anti-Parkinson della l-DOPA, allora è possibile aggiungerli in una

terapia combinata per ridurre le dosi di quest'ultima e di conseguenza ridurre gli effetti avversi come proprio la discinesia. Somministrando, ad esempio, un antagonista selettivo dei recettori CB₁, CE, a ratti parkinsoniani e discinetici, a dosi comprese tra 0,03 e 1 mg/kg da solo o in associazione a dosi sub-terapeutiche di l-DOPA, il CE ha aumentato in modo dose-dipendente la risposta alla levodopa (Cao *et al.*, 2007).

In uno studio preclinico è stata osservata l'attività di un agonista dei recettori CB₁, HU210, di un antagonista/agonista inverso di tali recettori, AM251, su ratti resi discinetici e dell'antagonista/agonista inverso dei recettori cannabinoidi tipo 1, rimonabant, su ratti non discinetici (Walsh *et al.*, 2010). Questi ratti sono stati lesionati con la neurotossina 6-OHDA e sono stati poi trattati con levodopa/benserazide (10/15 mg/kg) per 6 settimane, in seguito sono stati suddivisi in due macrogruppi:

- ratti che avevano sviluppato un grado apprezzabile di discinesia: detti "discinetici" (n=23);
- ratti che avevano sviluppato un grado molto basso di discinesia o che non avevano sviluppato alcuna discinesia: detti "non discinetici" (n=18).

Dopo le 6 settimane, entrambi i due gruppi sono stati trattati con levodopa e benserazide.

I 23 ratti discinetici hanno ricevuto poi somministrazioni dell'agonista HU210 (0,0, 0,5,5,0 e 50 µg/kg) o dell'antagonista AM251 (0,0 e 3 mg/kg) in modo casuale 30 minuti prima della somministrazione della levodopa.

I 18 ratti non discinetici hanno continuato a ricevere due volte a settimana iniezioni di mantenimento di levodopa e sono stati trattati con l'antagonista dei recettori CB₁, rimonabant, (3 mg/kg) quotidianamente per 18 giorni.

I risultati dello studio si possono così riassumere:

- la dose più alta di HU210 ha significativamente ridotto i movimenti anomali involontari nel gruppo di ratti discinetici, ma ha anche peggiorato

le normali funzioni motorie di questi animali. Il blocco dei recettori CB₁ con AM251 non ha invece ridotto i sintomi della LID;

- la somministrazione cronica dell'antagonista dei recettori CB₁ nel gruppo di ratti non discinetici, ha smascherato i sintomi discinetici, indicando che l'attività dei recettori CB₁ potrebbe essere protettiva nei confronti della LID.

Si deduce quindi l'agonismo a livello dei recettori cannabinoidi tipo 1 riduce in modo statisticamente significativo i sintomi della discinesia, ma questa azione non può essere sfruttata in clinica poiché porta a un peggioramento delle attività motorie normali, sarebbe quindi da studiare la possibilità di separare le due azioni dell' HU210.

Dagli studi riportati sembra che sussista una sorte di paradosso per quanto riguarda il coinvolgimento dei recettori CB₁ nella LID, in quanto talvolta l'azione antidiscinetica è legata a un antagonismo di tali recettori, mentre in altri casi invece è dovuta a un agonismo dei recettori in questione. Questa apparente contraddizione potrebbe essere spiegabile pensando alla vasta distribuzione dei recettori CB₁ a livello dei gangli della base e quindi sia un loro blocco sia una loro attivazione può modulare il rilascio di GABA e glutammato e quindi avere effetto sullo sviluppo della LID, inoltre gli endocannabinoidi hanno anche altri siti di azione oltre ai recettori CB₁ (Walsh *et al.*, 2010).

Un sito alternativo su cui agiscono gli endocannabinoidi è, ad esempio, il recettore canale vanilloide tipo 1 (TRPV1) che è un bersaglio d'azione dell'anandamide e tale recettore ha di per sé un'attività pro-discinetica.

La somministrazione di URB597, potente inibitore della FAAH (Fatty Acid Amine Hydrolase) enzima responsabile dell'idrolisi dell'anandamide e talvolta anche del 2-arachidonil glicerolo, non influenza i movimenti anomali involontari in ratti discinetici a meno che non sia somministrato in combinazione all'antagonista dei TRPV1, capsazepina, solo in questo

modo l'URB597 diminuisce in modo significativo gli AIMS totali (Morgese *et al.*, 2007). Tale evidenza deriva dal fatto che co-somministrando l'URB597 (0,3 mg/kg) e la capsazepina (10 mg/kg) in ratti parkinsoniani trattati con levodopa, si è assistito ad una importante riduzione degli AIMS 100 minuti dopo la somministrazione di levodopa, risultato che non si ottiene con la somministrazione di URB597 e capsazepina da soli. Ciò dimostra che l'aumento dei livelli di anandamide tramite il blocco dell'enzima responsabile della sua degradazione, produce un effetto antidiscinetico solo se associato al blocco contemporaneo dei recettori TRPV1, quindi i recettori CB₁ e TRPV1 giocano ruoli opposti nella discinesia indotta da l-DOPA.

In uno studio successivo è stato mostrato che la stimolazione dei recettori PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors), famiglia di fattori trascrizionali attivati dall'anandamide, contribuisce all'effetto antidiscinetico dell' URB597 + capsazepina e inoltre la stimolazione dei recettori PPAR γ da parte del loro agonista rosiglitazone (RGZ) allevia i movimenti anomali involontari e i markers della LID in ratti lesionati con la 6-OHDA, senza alterare l'attività anti-Parkinson della levodopa o la sua b disponibilità (Martinez *et al.*, 2015).

I ratti dopo la lesione con la 6-OHDA e ratti sani del gruppo di controllo hanno ricevuto levodopa + benserazide (6+12,5 mg/kg) una volta al giorno per tutta la durata dello studio, 13 giorni, e dal giorno 9 al giorno 11 sono stati così suddivisi e trattati:

- ratti lesionati: iniezioni intraperitoneali 15 minuti prima della levodopa dei seguenti farmaci, da soli o in associazione: capsazepina (CPZ, 10 mg/kg); URB597 (0,3 mg/kg); rosiglitazone (RGZ, 5 e 10 mg/kg); agonisti dei recettori PPAR α : oleiletanolammide (OEA, 5 e 10 mg/kg) o GW7647 (3,2 mg/kg) o WY14643 (5 mg/kg). Il gruppo ricevente URB597 + CPZ ha ricevuto anche, 15 minuti prima, l'antagonista del recettore CB₁ AM251 (1

mg/kg) nel giorno 12 e l'antagonista non selettivo dei recettori PPAR, BADGE (30 mg/kg) nel giorno 13. Il gruppo trattato con RGZ ha ricevuto 15 minuti prima, il dodicesimo giorno, 4 mg/kg di GW9662, antagonista selettivo dei recettori PPAR γ .

- ratti del gruppo di controllo: hanno ricevuto per tutto il periodo del trattamento levodopa + veicolo.

Il gruppo di controllo non ha mostrato segni di movimenti anomali involontari in nessun momento dell'esperimento.

Gli animali trattati con URB597 + CPZ hanno mostrato una notevole riduzione degli AIMs e sia AM251 sia BDG hanno annullato questo effetto antidiscinetico, indicando il coinvolgimento sia dei recettori CB₁ sia PPAR nell'azione anti-discinetici dei due farmaci. La somministrazione cronica di levodopa negli animali lesionati non ha avuto effetto sui livelli striatali dei recettori PPAR α e PPAR γ , questi ultimi erano localizzati nei neuroni dopaminergici.

Gli agonisti dei recettori PPAR α non hanno avuto alcun effetto sugli AIMs, mentre il rosiglitazone ha portato a una riduzione di questi movimenti indotti dalla levodopa e l'antagonista GW9662 selettivo per i recettori PPAR γ ha annullato tale effetto.

La somministrazione del rosiglitazone ha abbassato i livelli dei markers tipici della LID, zif-268, dinorfina, p-ERK 1/2, tranne che Δ FosB i cui livelli sono rimasti elevati.

Tramite la microdialisi è stato dimostrato che il rosiglitazone non influenza la biodisponibilità della l-DOPA nello striato dei ratti lesionati, mentre tramite test comportamentali condotti sui ratti è stato mostrato che il rosiglitazone non influenza l'attività terapeutica della l-DOPA.

Lo studio suggerisce quindi un possibile utilizzo clinico degli agonisti dei recettori PPAR γ nella terapia della discinesia indotta dalla l-DOPA,

sebbene sia da dimostrare in studi clinici l'efficacia di questi farmaci su pazienti parkinsoniani.

Uno studio su topi con lesione striatale causata da 6-OHDA ha dimostrato che la somministrazione combinata dell'analogo endocannabinoide, oleoiletanolammide (OEA), agonista dei recettori PPAR α e antagonista dei recettori TRPV1, ha effetti antidiscinetici confermati anche da una riduzione dei markers biologici della LID (Gonzalez-Aparicio and Moratalla, 2014).

I topi sono stati trattati con iniezioni giornaliere di l-DOPA/benserazide per sviluppare una forma apprezzabile di LID e successivamente hanno ricevuto OEA alle dosi di 0,5, 5 o 20 mg/kg oppure veicolo 15 minuti prima della somministrazione di l-DOPA. Inoltre sono stati somministrati ai topi anche l'antagonista dei recettori PPAR α , GW6471 e la capsaicina, agonista dei recettori TRPV1, per determinare se l'azione del OEA fosse dovuta al suo agonismo per i recettori PPAR α o al suo antagonismo nei confronti dei recettori TRPV1.

Solo la dose di 5 mg/kg di OEA è stata efficace nel ridurre i sintomi discinetici in modo significativo dopo 100 minuti dalla prima somministrazione e tale effetto si è verificato senza modificare l'efficacia terapeutica delle l-DOPA, anzi talvolta l'ha migliorata.

L'effetto dell'OEA è dovuto al suo antagonismo nei confronti dei recettori TRPV1 come dimostrato dal fatto che la somministrazione di 1 mg/kg di capsaicina ha bloccato in modo significativo l'effetto antidiscinetico dell'OEA.

Dal punto di vista clinico è stato osservato che l'estratto di cannabis somministrato per via orale (OCE) è probabilmente inefficace nella cura della discinesia indotta dalla l-DOPA (Koppel *et al.*, 2014).

4.10 Il sistema adrenergico

L'adrenalina e la noradrenalina attivano specifici recettori adrenergici, detti anche adrenocettori. I recettori adrenergici sono metabotropici accoppiati a proteine G e sono di due tipi: α e β che si suddividono in diversi sottotipi come descritto dalla seguente tabella:

α_1 (A,B,D)	Recettore eccitatorio post-sinaptico principalmente presente sulla muscolatura liscia dei vasi più piccoli
α_2 (A,B,C)	Recettore pre-sinaptico che regola tramite feedback negativo il rilascio del neurotrasmettitore
β_1	Recettore eccitatorio principalmente presente a livello cardiaco
β_2	Recettore inibitorio principalmente presente a livello della muscolatura liscia
β_3	Recettore eccitatorio presente principalmente a livello del tessuto adiposo

Il sistema adrenergico sembra avere un ruolo importante nella LID in quanto è stato osservato in studi postmortem su cervelli parkinsoniani, che la deplezione dei neuroni dopaminergici è accompagnata anche dalla deplezione dei neuroni noradrenergici nel locus coeruleus e inoltre, animali con lesioni sia dopaminergiche sia noradrenergiche erano più predisposti a sviluppare la discinesia indotta da l-DOPA, anche a dosi più basse di levodopa (Shin *et al.*, 2014). Questo studio si compone di due esperimenti condotti su ratti Sprague-Dawley:

- Esperimento 1: 8 ratti hanno ricevuto una sostanza tossica per la noradrenalina, chiamata anti-dopamine- β -hydroxylase (DBH)-Saporin [abbreviata come DBH-Saporin]. Dopo due settimane, 2 gruppi di 8 ratti ciascuno ha subito una lesione con la neurotossina 6-

OHDA nello striato. Tre settimane dopo i ratti sono stati trattati con dosi differenti di l-DOPA, apomorfina e con l'inibitore del trasportatore per la noradrenalina, reboxetina. Tre giorni dopo l'ultimo test discinetico, è stata applicata la HPLC alla corteccia e allo striato dei ratti per misurare i livelli di noradrenalina, dopamina e di DOPAC (catabolita della dopamina).

- Esperimento 2: 18 ratti hanno ricevuto la (DBH)-Saporin e dopo due settimane altri 30 ratti hanno subito una lesione con 6-OHDA nello striato. 13 ratti che avevano ricevuto 6-OHDA hanno poi ricevuto la DBH-Saporin.

La tossina (DBH)-Saporin è stata altamente efficace nel rimuovere i neuroni dopaminergici nei ratti lesionati con 6-OHDA e ciò ha portato a un peggioramento della discinesia indotta da l-DOPA, non dovuto a una modifica della densità delle fibre dopaminergiche in quanto non risultano cambiate. Questi risultati suggeriscono che la perdita dei neuroni noradrenergici è una condizione che può contribuire allo sviluppo e all'aggravamento della LID e anche dei sintomi motori del Parkinson.

La dopamina è il precursore diretto della noradrenalina nella biosintesi delle catecolamine, quindi sebbene nel Parkinson si riscontri una denervazione dei neuroni noradrenergici, una parte della dopamina somministrata ai pazienti, sottoforma di l-DOPA, viene trasformata in noradrenalina e quindi un'alterazione della trasmissione noradrenergica può essere coinvolta nello sviluppo dei problemi motori indotti dalla l-DOPA.

Uno studio ha investigato sui livelli di mRNA dei recettori α_{2A} e α_{2C} in modelli di ratti parkinsoniani e con discinesia indotta da l-DOPA e ne è risultato che nel locus coeruleus dei ratti parkinsoniani lesionati con 6-OHDA si ha un aumento dei livelli di mRNA dei recettori α_{2A} che vengono

stabilizzati dopo trattamento cronico con la l-DOPA (25 mg/kg + 6,25 mg/kg di benserazide), che induce discinesia (Alachkar *et al.*, 2012).

Ipotizzando che la discinesia indotta dalla levodopa sia dovuta a un'alterazione striatale delle monoammine dopamina, serotonina e noradrenalina, è stata studiata, tramite HPLC, l'influenza della somministrazione di dopamina esogena sul rilascio delle monoammine se somministrata a topi resi parkinsoniani con MPTP (Nicholas *et al.*, 2008). I topi sono stati resi discinetici con la somministrazione di un'alta dose di levodopa (200 mg/kg). Con l'HPLC, sono state analizzate la quantità di dopamina con i suoi metaboliti DOPAC (acido diidrossifenilacetico) e HVA (acido omovanillico), serotonina con il suo metabolita 5-HIAA (acido 5-idrossindolacetico) e noradrenalina con il suo metabolita MHPG (3-metossi-4-idrossifeniglicole).

La somministrazione della levodopa ha aumentato in modo significativo i livelli di dopamina e dei suoi metaboliti DOPA e HVA, mentre ha impoverito lo striato e il bulbo olfattivo di serotonina e noradrenalina, sebbene sembri che la diminuzione di noradrenalina nello striato sia dovuto più alla lesione con MPTP piuttosto che alla somministrazione di levodopa. In uno studio condotto su ratti lesionati con 6-OHDA e resi discinetici con l-DOPA + benserazide (6+15 mg/kg), si è osservato che la noradrenalina ha una potenza simile alla levodopa nell'indurre movimenti discinetici una volta che il fenomeno di priming è avvenuto (Buck and Ferger, 2009). L'indagine è stata effettuata somministrando nello striato lesionato e sano dei ratti discinetici, noradrenalina (0,04 nmol/min, 0,4 nmol/min) e l-DOPA (0,04 nmol/min, 0,4 nmol/min). Nello striato sano la somministrazione della noradrenalina e della l-DOPA non ha prodotto alcun sintomo di discinesia, mentre nello striato lesionato la l-DOPA ha indotto discinesia che è stata ulteriormente aggravata dalla somministrazione della noradrenalina.

Tali risultati propongono quindi di analizzare molecole antagoniste dei recettori adrenergici come possibili strategie terapeutiche della LID.

Alla luce di questi risultati, l'attenzione si è focalizzata su un antagonista dei recettori adrenergici α_1 , denominato HEAT, che alle dosi di 1 e 2 mg/kg somministrate a modelli di ratti parkinsoniani con discinesia indotta da levodopa, insieme all'idazoxan, α -antagonista non selettivo, 9 mg/kg e al propanololo, β -antagonista non selettivo, 20 mg/kg, conduce a una riduzione significativa dei movimenti discinetici (Buck and Ferger, 2010).

L'antagonista non selettivo dei recettori adrenergici α , yohimbina, era già stato descritto come farmaco che riduceva la gravità dei movimenti discinetici nei ratti lesionati con 6-OHDA (Lundblad *et al.*, 2002; Dekundy *et al.*, 2007).

L'idazoxan è stato somministrato, in scimmie lesionate con MPTP, a dosi comprese tra 0,25 e 10 mg/kg in associazione al veicolo o alla l-DOPA + benserazide (100/25 mg), l'esperimento è stato poi ripetuto somministrando la dose fissa di idazoxan 7,5 mg/kg per 10 giorni aggiungendo l-DOPA nei giorni 1,4,7 e 10 (Grondin *et al.*, 2000). Somministrato da solo (alle dosi comprese tra 5 e 10 mg/kg), l'idazoxan, non ha prodotto sintomi discinetici, mentre in associazione con l-DOPA ha ridotto in modo significativo i movimenti discinetici per tutti e 10 i giorni di trattamento, senza danneggiare l'attività antiparkinsoniana.

L'attività dell'idazoxan alle dosi di 10, 20 e 40 mg, per os, è stata ulteriormente testata clinicamente su 18 pazienti parkinsoniani e discinetici per assunzione di l-DOPA e la gravità della LID è stata ridotta dal pretrattamento dei pazienti con 20 mg di idazoxan senza deteriorare l'attività anti-Parkinson della levodopa (Rascol *et al.*, 2001).

L'antagonista dei recettori adrenergici α_2 , fipamezolo (JP-1730), somministrato alla dose di 10 mg/kg a uistiti lesionati con MPTP ha ridotto in modo significativo la discinesia indotta da l-DOPA senza danneggiare

l'attività terapeutica sul Parkinson di quest'ultima e il trattamento combinato di 10 mg/kg di fipamezolo e l-DOPA ha aumentato del 66% la durata d'azione della l-DOPA rispetto a quando somministrata da sola (Savola *et al.*, 2003).

Il fipamezolo è stato successivamente oggetto di uno studio clinico a doppio cieco condotto di 28 giorni condotto su 180 pazienti, provenienti dagli Stati Uniti e dall'India, affetti da Morbo di Parkinson che avevano sviluppato la LID (Lewitt *et al.*, 2012). I pazienti sono stati suddivisi casualmente in quattro gruppi che ricevevano:

- 1) placebo 3 volte al giorno per tutti e 28 i giorni dello studio;
- 2) una compressa da 30 mg di fipamezolo 3 volte al giorno per 28 giorni;
- 3) una compressa da 30 mg di fipamezolo 3 volte al giorno per i primi 7 giorni e una compressa da 60 mg di fipamezolo 3 volte al giorno dall'ottavo al ventottesimo giorno;
- 4) una compressa da 30 mg di fipamezolo 3 volte al giorno per i primi 7 giorni, una da 60 mg dal giorno 8 al giorno 14 e uno da 90 mg dal giorno 15 al giorno 28.

Il fipamezolo è stato somministrato in concomitanza alle tre dosi giornaliere di l-DOPA.

Sono state utilizzate le seguenti scale di valutazione: UPDRS, LIDS (Levodopa-Induced Dyskinesia Scale), CGI-I (Clinician Global Impression of Improvement) e PDYS (Parkinson Disease Dyskinesia Scale) e i pazienti hanno tenuto dei diari dove hanno registrato circa ogni mezz'ora la loro situazione riguardo la discinesia.

In generale non si è manifestata una riduzione significativa della discinesia, solo nel gruppo dei pazienti statunitensi si è registrato un significativo miglioramento della discinesia correlato alla dose di fipamezolo (90 mg), i pazienti indiani non hanno mostrato differenze, per quanto riguarda i

movimenti discinetici, tra i gruppi trattati con fipamezolo e quelli trattati con placebo.

Il fipamezolo non ha peggiorato i sintomi parkinsoniani e ha mostrato un buon profilo di tollerabilità in quanto non ha causato reazioni avverse importanti. Nella maggior parte dei casi si sono riscontrati nausea, vomito e aumento della pressione sanguigna; gli effetti avversi hanno avuto una distribuzione omogenea in tutti i pazienti e non erano correlati alla dose di fipamezolo.

I risultati suggeriscono quindi che il fipamezolo necessita di maggiori studi farmacologici per verificare il suo effettivo potenziale nel trattamento della discinesia in pazienti con Morbo di Parkinson.

Rimanendo sull'antagonismo degli α_2 adrenocettori, un altro farmaco interessante è il piribedil, agonista dopaminergico non ergolinico con proprietà antagoniste nei confronti dei recettori α_2 , che è stato studiato su ratti lesionati con 6-OHDA e discinesia indotta da l-DOPA e i suoi effetti sono stati paragonati a quelli dell'idazoxan e della clonidina, α_2 – agonista (Gerlach *et al.*, 2013).

Sui ratti sono stati testati gli effetti di 5, 10 o 40 mg/kg di piribedil, 0,15 mg/kg di clonidina e 10 mg/kg di idazoxan da soli o in combinazione e tutti e 3 i farmaci sono stati somministrati 5 minuti prima della l-DOPA/benserazide.

La seguente tabella riassume i risultati dello studio:

Pre-trattamento con piribedil
Il pre-trattamento con 5 e 40 mg/kg di piribedil ha diminuito in modo significativo la distonia assiale, la discinesia oro-linguale e le discinesie delle zampe anteriori, mentre ha aumentato in modo dose-dipendente la frequenza delle discinesie locomotorie. La riduzione della discinesia non è stata ottenuta con la dose di 15 mg/kg.

Pre-trattamento con idazoxan
Il pre-trattamento con 10 mg/kg di idazoxan ha avuto effetti simili a quelli di 40 mg/kg di piribedil, eccetto che non ha influenzato le discinesie locomotorie. L'idazoxan ha bloccato gli effetti del piribedil sulla distonia assiale e sulle discinesie delle zampe anteriori.
Pre-trattamento con clonidina
Il pre-trattamento con 0,15 mg/kg di clonidina ha ridotto tutti i movimenti anomali involontari tranne che la discinesia oro-linguale. Questo risultato è probabilmente dovuto all'effetto sedativo della clonidina. La clonidina ha inoltre bloccato gli effetti del piribedil sulla distonia assiale, sulla discinesia oro-linguale e sulle discinesie delle zampe anteriori.

La conclusione di questo studio è, quindi, che gli adrenocettori α_2 sono molto probabilmente coinvolti nei meccanismi che fanno parte dei sintomi motori della LID e sono di conseguenza necessari studi che investighino maggiormente la potenziale capacità del piribedil di alleviare la discinesia indotta da l-DOPA nei pazienti con Morbo di Parkinson.

Oltre all'antagonismo dei recettori α , anche quello dei recettori β sembra avere una buona efficacia nella LID.

L'antagonista non selettivo dei recettori adrenergici β , (\pm)-propanololo, e il suo enantiomero (-)-propanololo hanno ridotto l'espressione e lo sviluppo della discinesia in ratti lesionati con 6-OHDA (Lindenbach *et al.*, 2011) mostrando che anche i recettori β -adrenergici ricoprono un ruolo importante nella fisiopatologia della LID.

L'azione anti-discinetica del propanololo sembra essere dovuta alla sua capacità di attenuare, con meccanismo pre-sinaptico, l'efflusso di dopamina mediato dalla somministrazione di l-DOPA come dimostrato dal fatto che se somministrato propanololo (20 mg/kg) in associazione alla l-DOPA (6 mg/kg) in modelli animali di Parkinson si ottiene una riduzione

della discinesia, mentre se somministrato il β -bloccante in caso di discinesia indotta da agonisti dopaminergici non si verifica alcun effetto antidiscinetico (Bhide *et al.*, 2015).

Gli studi riportati dimostrano, quindi, che antagonizzare i recettori α e β sembra essere una valida e promettente terapia antidiscinetica, ma bisogna ricordare che l'utilizzo di questi farmaci potrebbe essere limitato dai loro effetti avversi sulla pressione sanguigna.

4.11 Il Sistema istaminergico

L'istamina esplica il suo ruolo di neurotrasmettitore stimolando quattro tipi di recettori istaminergici: H_1 , H_2 , H_3 e H_4 . I recettori studiati nel Parkinson e nella discinesia indotta da l-DOPA sono gli H_2 e gli H_3 ; sono entrambi recettori metabotropici accoppiati a proteine G, i primi sono accoppiati a proteine G_s , mentre i secondi sono accoppiati a proteine G_i . I recettori per l'istamina sono tutti espressi a livello cerebrale.

In studi post mortem su cervelli di pazienti con Morbo di Parkinson e su cervelli sani (gruppo di controllo) è stata esaminata la distribuzione delle fibre istaminergiche nella substantia nigra con metodi istochimici e si è osservata una connessione diretta tra le fibre istaminergiche e quelle dopaminergiche e nei pazienti parkinsoniani la densità di fibre istaminergiche nella pars compacta e nella pars reticulata della substantia nigra è risultata aumentata rispetto al controllo, così come anche la morfologia delle fibre istaminergiche risulta modificata; l'ipotesi è che questo aumento dell'innervazione istaminergica sia un meccanismo compensatorio per la perdita della dopamina (Anichtchik *et al.*, 2000).

Un altro studio post mortem su pazienti con Morbo di Parkinson, confrontati con pazienti sani di controllo, ha riscontrato livelli aumentati di istamina nella pars compacta della substantia nigra (201 % rispetto al

controllo), nel putamen (159%), nel globus pallidus interno (234%) e esterno (200%); mentre il metabolismo dell'istamina non era aumentato come dimostrato dall'analisi dei livelli del metabolita metil-istamina (Rinne *et al.*, 2002).

Nella substantia nigra di pazienti parkinsoniani è aumentata la densità dei recettori H_3 e nel globus pallidus esterno i livelli di mRNA dei recettori H_3 sono aumentati rispetto ai pazienti sani, mentre tali livelli risultano bassi nella substantia nigra (Anichtchik *et al.*, 2001).

La discinesia è associata a un'eccessiva attività colinergica nello striato e poiché le analisi dell'espressione genica indicano che i recettori per l'istamina H_2 sono espressi ad alti livelli negli interneuroni colinergici striatali, antagonizzando questi recettori con la famotidina, H_2 – antagonista, si ottiene una modulazione dell'attività degli interneuroni colinergici e una riduzione della LID, in topi lesionati con 6-OHDA (Lim *et al.*, 2015).

Un risultato simile si era ottenuto in un precedente studio su macachi lesionati con MPTP discinetici a cui era stata somministrata la famotidina alle dosi di 1,3 e 30 mg/kg: alla dose di 3 mg/kg si è osservato un potenziamento dell'attività anti-Parkinson e dalla durata d'azione di dosi basse di levodopa, senza produrre discinesia disabilitante, inoltre la famotidina non ha influenzato l'attività terapeutica di alte dosi di l-DOPA, e a tutte e tre le dosi somministrate è stata in grado di ridurre la corea causata da alte dosi di l-DOPA (Johnston *et al.*, 2010).

Uno studio su modelli parkinsoniani di ratti ha avuto come oggetto l'antagonista dei recettori H_2 , ranitidina somministrata sia in cronico sia in acuto (Cui *et al.*, 2014). Per questo studio sono stati utilizzati ratti a cui in cui è stato riprodotto un modello animali di Parkinson con la somministrazione della neurotossina 6-OHDA e successivamente è stata iniettata ai ratti levodopa + benserazide due volte al giorno per un totale di

21 giorno allo scopo di indurre una forma apprezzabile di discinesia. Lo studio di è composto di due esperimenti:

Esperimento 1
I ratti sono stati suddivisi in 3 gruppi e trattati con ranitidina alle dosi di 5,10 o 20 mg/kg (o veicolo) somministrate 5 minuti prima della levodopa + benserazide (25/12,5 mg/kg). E' stata così valutata la somministrazione in acuto della ranitidina.
Esperimento 2
I ratti sono stati suddivisi in 3 gruppi e trattati con ranitidina alle dosi di 5,10 o 20 mg/kg (o veicolo) somministrate 5 minuti prima della levodopa + benserazide (25/12,5 mg/kg) per un periodo di 22 giorni in modo da valutare il trattamento cronico con la ranitidina. Inoltre alla fine dei 22 giorno i ratti sono stati sacrificati e sono stati misurati con la PCR i livelli di pro encefalina e Arc, che sono overespressi in caso di LID.

La somministrazione acuta di 5, 10 o 20 mg/kg di ranitidina non ha avuto effetto sulla LID, mentre la somministrazione cronica di 10 e 20 mg/kg di ranitidina in associazione alla l-DOPA ha ridotto l'espressione della LID nei ratti senza influenzare l'attività anti-Parkinson.

L'analisi con la PCR ha rivelato che i livelli di Arc e Proencefalina, già aumentati in caso di Parkinson, sono aumentati ulteriormente con lo sviluppo della discinesia indotta da l-DOPA e il trattamento con 10 mg/kg di ranitidina previene questo aumento.

Poiché la stimolazione dei recettori pre-sinaptici H₃ inibisce il rilascio striatale di dopamina e di glutammato, sono stati testati due agonisti di questi recettori, immepip e imetit in modelli animali di Parkinson e ne è risultato che la somministrazione di 1 mg/kg di immepip con 15 mg/kg di levodopa ha prodotto un discinesia totale molto minore rispetto a quella prodotta dalla levodopa da sola, la somministrazione di l-DOPA con 10

mg/kg di immapip o imetit ha ridotto la corea ma non la distonia e le due molecole non hanno influenzato l'attività anti-Parkinson della levodopa (Gomez-Ramirez *et al.*, 2006).

4.12 La trasmissione colinergica

L'acetilcolina è un neurotrasmettitore che agisce su due classi recettoriali: i recettori nicotinici, ionotropici e i recettori muscarinici, metabotropici. I recettori nicotinici presentano diverse subunità e quelle espresse a livello neuronale sono le α dalla 2 alle 7 e le β_2 (anche 3 e 4). I sottotipi muscarinici espressi a livello centrale sono gli $M_{1,4,5}$.

Da studi condotti su modelli parkinsoniani di ratti lesionati con la neurotossina 6-OHDA, risulta che alla discinesia indotta da trattamento ripetuto con l-DOPA si accompagna un aumento dell'eccitabilità dei neuroni colinergici striatali, ipotesi confermata dalla capacità dell'antagonista muscarinico, diciclomina 15 mg/kg, di inibire la LID (Ding *et al.*, 2011).

La deplezione, di circa il 93%, degli interneuroni colinergici (ChIs) striatali tramite l'utilizzo della subunità A della tossina della difterite (DT-A) ha confermato il ruolo chiave della trasmissione colinergica nella discinesia, in quanto la deplezione dei ChIs preventiva al trattamento con levodopa ha attenuato l'espressione della LID senza alterare gli effetti anti-Parkinson (Won *et al.*, 2014).

È stato dimostrato che le subunità β_2 dei recettori nicotinici giocano un ruolo importante nella fisiopatologia della LID e, poiché a livello striatale i sottotipi recettoriali più espressi sono gli $\alpha_4\beta_2$ e $\alpha_6\beta_2$, utilizzare molecole selettive per questi sottotipi può avere influenza sull'espressione della discinesia (Quik *et al.*, 2013a).

In uno studio effettuato su scimmie lesionate con la neurotossina MPTP, sono stati testati due farmaci agonisti dei recettori nicotinici, vareniclina

(agonista parziale $\alpha_4\beta_2$ e agonista totale delle subunità α_7) e TC-8831 (agonista dei recettori nicotinici contenenti i sottotipi $\alpha_4\beta_2$ e $\alpha_6\beta_2$), per valutare i loro effetti sulla LID (Zhang *et al.*, 2013).

In tale studio le scimmie sono state divise in due macrogruppi: A) erano già state trattate in precedenza con nicotina o con farmaci specifici per i recettori nicotinici, B) non erano mai state trattate con farmaci per i recettori nicotinici. I gruppi A e B sono stati ulteriormente suddivisi per ricevere uno dei seguenti trattamenti: veicolo, nicotina e agonista nicotinico, vareniclina (0,003, 0,01 e 0,03 mg/kg) e TC-8831 (0,01 e 0,03 mg/kg) 30 minuti prima della l-DOPA. Le dosi più alte di vareniclina (0,06 e 0,1 mg/kg) e TC-8831 (0,05, 0,1 e 0,3 mg/g) sono state somministrate nello stesso momento della l-DOPA. Il trattamento con vareniclina alle dosi di 0,03, 0,06 e 0,1 mg/kg ha ridotto la LID di circa il 45% e per far ricomparire la LID sono state necessarie 5 settimane di washout della vareniclina; inoltre la vareniclina non ha influenzato i sintomi parkinsoniani. L'unico effetto avverso della vareniclina è stato il vomito.

Alla dose di 0,03 mg/kg il TC-8831 ha ridotto di circa il 30 % la LID.

Gli agonisti dei recettori nicotinici sono dunque efficaci nel ridurre la LID, probabilmente provocando internalizzazione dei recettori.

I due farmaci dello studio hanno anche il vantaggio di essere stati somministrabili per via orale e di non influenzare l'attività terapeutica della l-DOPA.

Il TC-8831 è stato oggetto anche di un altro studio in cui macachi lesionati con MPTP sono stati trattati per 8 settimane con TC-8831 alle dosi orali di 0,03, 0,1 e 0,3 mg/kg somministrate due volte al giorno insieme a una dose giornaliera di l-DOPA; nelle settimane successive il TC-8831 è stato sospeso e si è continuato il trattamento con solo l-DOPA (Johnston *et al.*, 2013). Alle tre dosi somministrate il TC-8831 è stato ben tollerato ed ha aumentato di circa l'82% la durata del "good on-time", ovvero dello stato

funzionale in cui la levodopa esercita la sua azione anti-Parkinson senza presentare discinesia e tale effetto non ha causato alterazioni o peggioramenti dei sintomi parkinsoniani.

Un'altra evidenza del fatto che la nicotina e gli agonisti dei recettori nicotinici sono in grado di attenuare la discinesia indotta da l-DOPA, deriva da uno studio condotto su scimmie lesionate con MPTP e con discinesia indotta da 5 mg/kg di levodopa somministrata oralmente due volte al giorno in cui si è osservato che il pretrattamento con nicotina ha ridotto del 50% i movimenti discinetici totali senza danneggiare i sintomi parkinsoniani degli animali (Quirk *et al.*, 2007).

Uno studio ha valutato gli effetti del trattamento con nicotina in scimmie rese parkinsoniane e rese discinetiche con l-DOPA, utilizzando però due gruppi diversi di scimmie: uno con Parkinson lieve e uno con Parkinson più grave (Quirk *et al.*, 2013b). Ne è risultato che il pretrattamento con nicotina 300 µg/ml ha prevenuto lo sviluppo della LID in scimmie con Parkinson lieve, questo effetto preventivo è stato mantenuto anche con la diminuzione della dose a 50 µg/ml e annullato con la rimozione di nicotina. Il pretrattamento di 6 settimane con nicotina in scimmie con Parkinson più grave non ha avuto alcun effetto sulla LID, nemmeno in seguito al prolungamento di tale trattamento per altre sei settimane.

Due agonisti delle subunità β_2 dei recettori nicotinici, pozaniclina (ABT-089) e ABT-894, sembrano essere potenziali candidati per il trattamento della LID (Zhang *et al.*, 2014a). Questo studio è stato effettuato su due gruppi di scimmie lesionate con MPTP e rese discinetiche con somministrazione di l-DOPA:

- A) 17 scimmie che erano già state trattate in precedenza con nicotina o con farmaci attivi sui recettori nicotinici;
- B) 16 scimmie che non avevano mai ricevuto farmaci attivi sui recettori nicotinici, in precedenza.

Entrambi i gruppi A e B sono stati a loro volta suddivisi in 3 gruppi che ricevevano veicolo, ABT-089 o ABT-894 o nicotina. L'ABT-089 è stato somministrato oralmente due volte al giorno alla dosi comprese tra 0,01 e 1 mg/kg , 30 minuti prima della l-DOPA. ABT-089 alle dosi di 0,10, 0,3 e 1 mg/kg ha ridotto significativamente la LID nel gruppo A e nel gruppo B (0,10 e 0,30 mg/kg) e non ha influenzato i sintomi parkinsoniani.

L'ABT-894 alle dosi di 0,0001 e 0.0003 mg/kg non ha influenzato in modo significativo la LID nel gruppo A, mentre ha ridotto la discinesia alle dosi di comprese tra 0,001 e 0,10 mg/kg. Nel gruppo B, l'ABT-894 non ha avuto effetto sulla LID alla dose di 0,001 mg/kg, ma ha prodotto una significativa riduzione della discinesia alle dosi comprese tra 0,003 e 0,10 mg/kg. Sono state necessarie 6 settimane di washout di ABT-894 per ristabilire i livelli iniziali di LID. Come l'ABT-089, l'ABT-894 non ha influenzato l'attività anti-Parkinson della levodopa.

Questi due agonisti nicotinici sembrano quindi rappresentare una valida strategia terapeutica per il trattamento clinico della discinesia indotta da l-DOPA in quanto non presentano effetti collaterali importanti e non portano a un peggioramento del Parkinson.

L' agonista potente e selettivo per le subunità α_7 dei recettori nicotinici, ABT-107, alle dosi di 0,03 e 1 mg/kg somministrate per via orale ha diminuito del 40-60% la LID che è tornata ai livelli iniziali soltanto dopo 6 settimane di washout di ABT-107 e inoltre non è stata sviluppata tolleranza al farmaco in quanto una sua successiva somministrazione ha ridotto la LID del 50-60% (Zhang *et al.*, 2014b).

All'interno dello stesso studio, l'ABT-107 è stato testato anche in combinazione all'ABT-894 e la LID è stata ridotta di circa il 50-60%, effetto simile a quello prodotto dall'ABT-894 se somministrato da solo alla dose di 0,01 mg/kg in scimmie discinetiche.

Studiando su sei scimmie parkinsoniane e discinetiche, l'agonista parziale delle subunità α_7 dei recettori nicotinici, AQW051, si è osservata una significativa riduzione della LID con la somministrazione di 15 mg/kg del farmaco senza compromissione dell'attività terapeutica della l-DOPA (Di Paolo *et al.*, 2014). Descrivendo in maniera più approfondita tale studio, le sei scimmie *Macaca fascicularis* precedentemente lesionate con MPTP e rese discinetiche con somministrazione orale giornaliera per un mese di capsule di l-DOPA/benserazide, (100/25 mg), hanno ricevuto dosi crescenti di AQW051 (2, 8 e 15 mg/kg) in un trattamento combinato con la l-DOPA e cinque giorni dopo l'ultima somministrazione di AQW051 le scimmie hanno ricevuto soltanto l-DOPA.

Il farmaco in oggetto, AQW051, sembra avere un ottimo potenziale terapeutico per la LID, in quanto non ha in nessun modo e in nessuna dose alterato gli effetti terapeutici della l-DOPA per il Parkinson, ma anzi ne ha aumentato la durata in modo dose-dipendente (aumento di 30 minuti alla dose di 15 mg/kg di AQW051) e alla dose di 15 mg/kg ha diminuito i movimenti discinetici di circa il 60%.

4. 13 La trasmissione tachichinergica

Le tachichinine sono una famiglia di neuropeptidi (neurochinina A, neurochinina B e sostanza P) che esercitano la loro azione su tre recettori metabotropici, tutti presenti a livello cerebrale:

- NK₁ : a cui si lega la sostanza P, è prevalentemente presente nello striato;
- NK₂ : a cui si lega la neurochinina A
- NK₃ : a cui si lega la neurochinina B.

Le tachichinine sono sintetizzate a partire da precursori detti preprotachichinine (PPT), in particolare le PPT-A codificano per la sostanza P e per la neurochinina A e le PPT-B per la neurochinina B.

Questi neuropeptidi sono stati abbondantemente studiati nel Parkinson, specialmente la sostanza P in quanto è quella preferenzialmente espressa a livello striatale, ma il loro ruolo nella discinesia non è ancora stato studiato in modo preciso (Huot *et al.*, 2013a).

In studi su modelli animali di Parkinson come macachi e uistiti lesionati con MPTP o ratti lesionati con 6-OHDA, è stato osservato che i livelli di mRNA codificante per le PPT sono diminuiti in seguito alla lesione e il trattamento cronico con la l-DOPA sembra ristabilire i livelli iniziali (Huot *et al.*, 2013a).

Tali studi però non permettono di descrivere una correlazione tra i livelli di mRNA per le PPT e l'insorgenza della discinesia.

È stato effettuato uno studio per analizzare l'espressione genica della neurochinina B e la regolazione dei livelli di mRNA della neurochinina B e della sostanza P, dopo il trattamento con la l-DOPA in modelli animali di Parkinson e sono state utilizzate anche molecole attive sui recettori NK₃ per esaminare il loro ruolo nella trasmissione dopaminergica (Zhang *et al.*, 2008).

Questo studio mostra che la lesione con 6-OHDA porta a un aumento dei livelli di mRNA della neurochinina B e a una diminuzione dei livelli di mRNA per la sostanza P, questi ultimi livelli sono regolarizzati dalla somministrazione acuta di 100 mg/kg di l-DOPA, mentre invece la somministrazione cronica di l-DOPA conduce ad un aumento dei livelli di mRNA della neurochinina B nello striato lesionato.

I recettori NK₃ stimolati dalla neurochinina B modulano anche la trasmissione dopaminergica in quanto la stimolano a livello pre-sinaptico e

la inibiscono a livello post-sinaptico, questa inibizione funziona come una sorta di feedback negativo sugli effetti mediati dalla l-DOPA.

La sostanza P è espressa con la dinorfina a livello striatale nella via diretta e la sua espressione aumenta con il trattamento con l-DOPA, di fatti è stato osservato che la somministrazione giornaliera di un antagonista dei recettori per la sostanza P NK_1 , NAT (N-acetyl-L-tryptophan), riduce l'insorgenza della LID senza avere ripercussioni motorie (Thornton *et al.*, 2014).

Tale evidenza deriva dal trattamento di ratti precedentemente lesionati con la neurotossina 6-OHDA, con iniezioni di l-DOPA (6 mg/kg + 15 mg/kg di benserazide), NAT (0,5 mg/kg), associazioni di l-DOPA con NAT (0,5 o 5 mg/kg) oppure soluzione fisiologica per una durata di 21 giorni.

Il trattamento con l-DOPA ha aumentato i livelli di sostanza P nella substantia nigra che erano diminuiti in seguito alla lesione con 6-OHDA, ma la l-DOPA somministrata da sola ha anche dato origine a movimenti discinetici, cosa che non si è verificata nel gruppo trattato con soluzione fisiologica e nel gruppo trattato soltanto con NAT.

Il trattamento con NAT immediatamente precedente alla somministrazione della l-DOPA ha ridotto l'insorgenza della LID senza interferire con l'effetto terapeutico della l-DOPA, suggerendo un potenziale uso clinico degli antagonisti dei recettori per la sostanza P NK_1 nel trattamento della discinesia indotta da l-DOPA nel Parkinson.

La trasmissione tachininergica appare dunque implicata nei meccanismi con cui la discinesia si sviluppa, sebbene non sia ancora chiaro il suo ruolo e siano necessari studi più approfonditi.

4.14 Fattori di trascrizione e segnali intracellulari

I vari neurotrasmettitori, sopra descritti, coinvolti nella fisiopatologia della LID legandosi ai propri recettori scatenano cascate di segnali intracellulari e modulano l'espressione di fattori di trascrizione e di fatti si è visto che molecole che interferiscono direttamente con questi fattori o segnali intracellulari alleviano la discinesia, facendo pensare a una possibile polifarmacoterapia per poter modulare diversi neurotrasmettitori (Huot *et al.*, 2013a).

Parlando del sistema oppioide, si è osservato che nella discinesia indotta da l-DOPA sono aumentati i livelli di mRNA per le prodinorfine nello striato e che questo aumento è correlabile allo sviluppo di movimenti discinetici.

Il CREB (cyclic AMP response-element binding protein) è un fattore di trascrizione che viene attivato dalla fosforilazione dei residui di serina ed esso media l'induzione dell'espressione del gene per la prodinorfina da parte della dopamina nei neuroni striatali sani, perciò si è studiata la sua funzione nello striato di modelli animali lesionati con 6-OHDA e ne è risultato che il silenziamento del CREB blocca o attenua l'induzione dell'espressione genica della prodinorfina da parte della l-DOPA (Cenci, 2002).

Un'altra famiglia di fattori di trascrizione che è coinvolta nella LID, è quella delle Fos che subiscono induzione nello striato a seguito del trattamento con agonisti dopaminergici:

- la somministrazione acuta di l-DOPA induce alti livelli di c-Fos, mentre la somministrazione cronica ne causa una downregulation;
- i livelli striatali di FosB e della sua variante di splicing Δ FosB aumentano negli animali discinetici e il silenziamento di FosB con un oligonucleotide antisense ha causato una significativa attenuazione dei movimenti discinetici e dell'induzione

dell'espressione genica della prodinorfina causati dalla l-DOPA (Cenci, 2002).

Alla luce di queste osservazioni, la discinesia potrebbe essere prevenuta con molecole che inibiscano la sovra-espressione di questi fattori di trascrizione.

Le stesse conclusioni erano già state tratte da uno studio precedente effettuato su ratti lesionati con 6-OHDA in cui si osserva che:

- l'espressione striatale delle proteine correlate alla FosB sono aumentate in modo significativo negli animali che sviluppano discinesia in seguito alla somministrazione della l-DOPA;
- queste proteine sono state ritrovate nelle stesse regioni striatali che mostravano un aumento dei livelli di mRNA per le prodinorfine e nelle stesse cellule;
- l'infusione dell'oligonucleotide antisense per le FosB/ Δ FosB ha inibito i movimenti discinetici assiali, delle zampe anteriori e oro-linguali, ma non locomotori (Andersson *et al.*, 1999).

In uno studio recente, a ratti lesionati precedentemente con la neurotossina 6-OHDA sono stati indotti elevati livelli di Δ FosB, tramite un vettore virale, all'interno della parte di striato denervato dalla dopamina ed è stato osservato che i ratti così trattati sviluppavano discinesia già dopo la prima iniezione intraperitoneale di l-DOPA (Cao *et al.*, 2010).

All'interno dello stesso studio è stato testato anche se l'espressione di JunD, fattore di trascrizione che si lega all'AP-1 e spesso associato alla Δ FosB, aumentava in seguito all'aumento della Δ FosB dopo l'inserimento del vettore virale, ma si è visto che questa correlazione non sussiste e l'espressione di JunD è aumentata dalla lesione dopaminergica.

I livelli striatali della Δ FosB sono correlati alla gravità della discinesia indotta in modelli parkinsoniani di macachi trattati con l-DOPA, ma l'aumento dei livelli di Δ FosB indotto dal vettore virale non altera la

discinesia negli animali che hanno già subito il priming, mentre la sovra-espressione della Δ JunD (variante di JunD priva di un dominio di trans-attivazione e agente come fattore di inibizione della Δ FosB) diminuisce significativamente la gravità della LID senza alterare gli effetti anti-Parkinson della l-DOPA (Berton *et al.*, 2009).

La somministrazione di l-DOPA conduce all'attivazione, mediata dal recettore dopaminergico D₁, della mTOR (bersaglio della rapamicina nei mammiferi complex 1 abbreviato come mTORC1) selettivamente all'interno dei neuroni GABAergici che proiettano direttamente dallo striato alle strutture di output dei gangli della base e questa attivazione persiste anche con lo sviluppo della discinesia (Santini *et al.*, 2009).

L'inibitore di mTORC1, rapamicina, previene lo sviluppo di discinesia senza interferire con l'attività terapeutica della l-DOPA, rendendo la cascata del segnale di mTORC1 un promettente bersaglio per la terapia della LID (Santini *et al.*, 2009).

La fosfoproteina di 32 kDa regolata dalla dopamina e dal cAMP (DARPP-32) è uno dei principali target della trasmissione dopaminergica nello striato e una volta fosforilata a livello del residuo Thr34 essa promuove la fosforilazione potenziando le funzioni di numerosi effettori cellulari come i recettori AMPA e NMDA (Huot *et al.*, 2013a).

Diversi studi hanno trovato livelli aumentati di DARPP-32 in modelli animali di Parkinson resi discinetici con l-DOPA e questi livelli sarebbero correlabili alla gravità dei movimenti discinetici, di fatti l'aumento dei livelli di Cdk5 (cyclin-dependent kinase 5) osservato nello striato di animali discinetici porta alla fosforilazione della DARPP-32 a livello del residuo Thr75 riducendo la capacità della DARPP-32 di attivare i suoi substrati, l'aumento di Cdk5 sembra quindi un meccanismo compensatorio dell'aumento della DARPP-32 nella LID (Huot *et al.*, 2013a).

Scimmie discinetiche mostrano un'aumentata attività della PKA (proteina chinasi A cAMP-dipendente) che si rispecchia in un potenziamento della fosforilazione di alcuni suoi substrati come ad esempio la fosforilazione della DARPP-32 a livello del residuo Thr34 (Azkona *et al.*, 2014).

L'attivazione della fosfoproteina DARPP-32 media anche la fosforilazione delle proteine chinasi regolate da segnali extracellulari ERK1 e ERK2 e quindi nella discinesia anche i livelli di queste due chinasi sono anomali, di fatti in ratti discinetici la fosforilazione delle ERK risulta aumentata (Huot *et al.*, 2013a).

L'aumento dei livelli di ERK2 è associato al trattamento con l-DOPA, indipendentemente dallo sviluppo di discinesia (Azkona *et al.*, 2014).

I recettori dopaminergici D₂ stimolati attivano la cascata del segnale di Akt (proteina chinasi B che stimola l'apoptosi fosforilando vari substrati proteici nei residui di serina e treonina) e GSK3 (glicogeno sintasi chinasi 3 che fosforila i substrati proteici nei residui di serina e treonina), in scimmie discinetici si è visto che un'alterazione di questa cascata nello striato è correlata allo sviluppo di movimenti discinetici (Azkona *et al.*, 2014).

Un altro regolatore dell'attività delle ERK è il fattore CalDAG-GEF 1 e 2 (fattore di scambio del nucleotide guanina regolato da calcio e diacilglicerolo) ed è stato dimostrato che anche i suoi livelli sono alterati nella LID (Huot *et al.*, 2013a).

Topi transgenici a cui è stato eliminato il Ras-GRF1 (fattore 1 di rilascio del nucleotide Ras-guanina), altro regolatore delle ERK, hanno mostrato una riduzione dei movimenti discinetici (Huot *et al.*, 2013a).

Le proteine ERK inoltre partecipano all'attivazione del mTOR che prima si è visto essere coinvolto nella LID.

La proteina G α_{olf} è stata precedentemente descritta in quanto ha il ruolo di regolare la produzione di cAMP e in ratti parkinsoniani discinetici i suoi livelli sono aumentati e vengono normalizzati con l'agonista dei recettori

D₁, SKF-81,297; probabilmente l'aumento dei livelli della proteina G α_{olf} è un meccanismo compensatorio per cercare di ristabilire i livelli di cAMP nella discinesia (Huot *et al.*, 2013a).

4.15 Concetti emergenti nella discinesia

Con le continue ricerche sulla fisiopatologia e sulla possibile terapia della discinesia indotta da l-DOPA, sono emersi anche altri sistemi che possono influenzare questa condizione o che sono da essa influenzati.

4.15.1 Angiogenesi e barriera emato-encefalica

L'angiogenesi legata al fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) e le associate alterazioni della permeabilità della barriera emato-encefalica (BEE) sono state correlate alla LID e il recettore per l'angiotensina II AT1 se attivato stimola la sintesi del VEGF, aumentando anche la permeabilità della barriera emato-encefalica (Munoz *et al.*, 2014).

I livelli di VEGF erano elevati nello striato denervato dalla dopamina di ratti lesionati con la neurotossina 6-OHDA e anche in pazienti con una storia clinica di discinesia e inoltre nello stato discinetico si è osservato un aumento della permeabilità della BEE (Huot *et al.*, 2013a).

Il candesartan è un antagonista dei recettori AT1 e fra i sartani è il più abile nell'attraversare la barriera emato-encefalica, quindi riesce a inibire gli effetti dell'angiotensina II a livello cerebrale senza avere effetti sulla pressione sanguigna a basse dosi, per questi motivi è stato studiato su modelli animali di LID per investigare i suoi effetti e il coinvolgimento dei livelli di VEGF nella discinesia (Munoz *et al.*, 2014). In questo studio, sono stati utilizzati ratti Sprague-Dawley suddivisi in gruppi sperimentali e sono stati condotti cinque esperimenti, riassunti nella seguente tabella:

Esperimento 1	
Due gruppi (Ia e Ib) di ratti lesionati con la 6-OHDA sono stati trattati con l-DOPA 6 mg/kg al giorno e benserazide 10 mg/kg per 2-3 settimane.	
<p>Gruppo Ia (n=10) è stato trattato anche con candesartan per 5 giorni precedenti alla prima iniezione di l-DOPA e poi 30 minuti dopo ogni iniezione di l-DOPA.</p>	<p>Gruppo Ib (n=10) ha ricevuto in contemporanea alla l-DOPA iniezioni di soluzione fisiologica</p>
Esperimento 2	
Sono stati esaminati gli effetti della lesione dopaminergica sull'espressione di VEGF e IL-1 β su ratti lesionati con 6-OHDA (n=8) paragonati al gruppo di controllo (n=8).	
Esperimento 3	
I ratti lesionati con la 6-OHDA sono stati trattati con 6 mg/kg di l-DOPA e 10 mg/kg di benserazide per 3 settimane e sono stati individuati due gruppi: ratti discinetici (n=12) e ratti non discinetici (n= 7), sui due gruppi è stata analizzata l'espressione di VEGF e Il-1 β .	
Esperimento 4	
I ratti lesionati con la 6-OHDA sono stati trattati con candesartan da solo (n=7) o con soluzione fisiologica (n=7) per valutare gli effetti del candesartan sull'espressione di VEGF e IL-1 β .	
Esperimento 5	
Effettuato per analizzare gli effetti dell'angiotensina II sull'espressione di VEGF nel sistema nigrostriatale e gli animali sono stati iniettati con angiotensina II (n=7) o con il veicolo per formare il gruppo di controllo (n=7).	

I risultati dello studio sono i seguenti:

- 1) i ratti che hanno ricevuto il candesartan in associazione alla l-DOPA hanno mostrato una significativa riduzione della LID rispetto al gruppo trattato solo con l-DOPA;
- 2) l'espressione di VEGF e IL-1 β nello striato dei ratti denervati dalla dopamina in quanto lesionati con 6-OHDA è significativamente aumentata rispetto al gruppo di controllo;
- 3) l'espressione di VEGF e IL-1 β è significativamente più alta nello striato e nella substantia nigra dei ratti discinetici rispetto ai ratti non discinetici;
- 4) i livelli di VEGF e IL-1 β nello striato e nella substantia nigra dei ratti discinetici sono stati diminuiti dal trattamento con candesartan;
- 5) la somministrazione di angiotensina II nei ratti ha aumentato in modo significativo l'espressione del VEGF nello striato nella substantia nigra.

Lo studio mostra quindi che l'angiotensina II porta a un aumento dei livelli di VEGF nello striato e nella substantia nigra e tali livelli possono essere normalizzati con l'antagonista dei recettori AT1, candesartan, che riduce, nella LID, i livelli di VEGF e del marker della neuro-infiammazione IL-1 β . L'angiogenesi indotta dal VEGF e la neuro-infiammazione indotta da IL-1 β sembrano quindi promuovere la discinesia tramite un meccanismo che viene inibito dagli antagonisti dei recettori AT1 e nell'analizzare il meccanismo con cui ciò avviene bisogna tenere in considerazione che l'IL-1 β è un attivatore delle proteine ERK così come l'angiotensina II che tramite i recettori AT1 stimola la sintesi di VEGF via ERK1/2 (Munoz *et al.*, 2014).

Le statine, oltre alla loro principale attività ipocolesterolemizzante, riescono a interferire con la via Ras-ERK inibendo l'attività della Ras e di conseguenza anche la fosforilazione della via Ras-ERK1/2 e di fatti una di esse, la simvastatina è stata somministrata a scimmie e pazienti parkinsoniani discinetici per studiare la sua azione sulla LID, dato che sui

modelli di ratti parkinsoniani discinetici era stato osservato che le statine riducevano sia la LID sia la fosforilazione delle ERK1/2 (Tison *et al.*, 2013).

Per questo studio è stata scelta la simvastatina in quanto è la statina più utilizzata, attraversa la BEE e il suo utilizzo cronico non è correlato all'incidenza del Parkinson. Alle dosi di 1,5, 3 e 6 mg/kg la simvastatina ha ridotto in modo significativo la LID nelle scimmie senza peggiorare i sintomi parkinsoniani, mentre nei pazienti parkinsoniani con discinesia la dose di 40 mg di simvastatina non ha prodotto nessun risultato nei confronti della LID. Probabilmente il fallimento nell'ottenere un risultato nei pazienti è dovuto alla dose utilizzata che era più bassa di quella usata nelle scimmie, ma è stata così scelta per non incorrere nel pericoloso effetto collaterale di rabdomiolisi tipico delle statine e inoltre il periodo di trattamento dei pazienti parkinsoniani è stato di 10 giorni, forse un periodo più lungo avrebbe dato risultati più significativi.

4.15.2 Infiammazione

Come appena descritto, I livelli dell'interleuchina-1 β (marker di neuro-infiammazione) sono aumentati nello striato di ratti parkinsoniani discinetici trattati con l-DOPA (Munoz *et al.*, 2014).

In ratti emi-parkinsoniani sono stati trovati aumentati i livelli di mRNA di IL-1 β nello striato denervato da dopamina in seguito alla somministrazione di l-DOPA, erano aumentati anche i livelli di TNF- α e di IL-6 ma in modo meno significativo, la dose di corticosterone più efficace come antidiscinetico 3,75 mg/kg ha completamente normalizzato l'aumento dei livelli di mRNA di IL-1 β nella parte lesionata e ha attenuato i livelli striatali di mRNA di PPE e PPD, aumentati nella LID, indicando che il

corticosterone può influenzare sia la via diretta sia la via indiretta (Barnum *et al.*, 2008).

La somministrazione dell'antagonista dei recettori per le interleuchine-1, IL-1ra, direttamente nello striato dei ratti trattati con l-DOPA ha diminuito, alla dose di 100 µg, in modo significativo l'espressione dei movimenti discinetici (Barnum *et al.*, 2008).

Sebbene non è ancora chiaro come l'infiammazione sia correlata alla LID e come il corticosterone espliciti il suo effetto antidiscinetico, esso sembra comunque un buon candidato nella terapia della LID in quanto probabilmente agisce come un secondo messaggero comune al sistema delle interleuchine e ai meccanismi della LID, questa connessione fra i due sistemi è supportata anche dal fatto che il corticosterone riduce i livelli di PPE e PPD, normalizzando l'attività della via diretta.

4.15.3 Acidi Grassi

Studiando gli effetti dell'acido grasso polinsaturo DHA, acido docosaesaenoico, sulla LID in scimmie parkinsoniane, somministrandolo prima dell'esposizione alla l-DOPA in un gruppo e dopo l'esposizione alla l-DOPA nell'altro gruppo, si è osservato che il DHA riesce a ritardare lo sviluppo della LID o a diminuire la sua gravità senza alterare gli effetti terapeutici della l-DOPA rappresentando quindi una possibile strategia terapeutica per migliorare la qualità di vita dei pazienti con Morbo di Parkinson (Samadi *et al.*, 2006).

Soni stati analizzati, mediante gas-cromatografia, campioni post mortem di tessuto cerebrale di pazienti e scimmie parkinsoniane trattati con l-DOPA per osservare la relazione tra i livelli di acidi grassi e la somministrazione di l-DOPA (Julien *et al.*, 2006). Da tale analisi è risultato che:

- i profili di acidi grassi nelle cortecce dei pazienti e delle scimmie discinetici non erano molto differenti dai loro gruppi di controllo;
- la somministrazione di alte dosi di levodopa ha portato a un aumento degli acidi grassi saturi e a una riduzione degli acidi grassi monoinsaturi nella corteccia dei pazienti parkinsoniani;
- i livelli di acido arachidonico sono aumentati nella corteccia dei pazienti parkinsoniani dopo anni di trattamento con la l-DOPA;
- la l-DOPA, alle dosi tali da indurre discinesia, conduce a un aumento degli acidi grassi polinsaturi omega-6 (come l'acido arachidonico) e a una riduzione degli acidi grassi polinsaturi omega-3 (come il DHA) nella corteccia delle scimmie discinetiche (Julien *et al.*, 2006).

Il plasmalogenil- etanolamina è un fosfolipide che svolge diverse funzioni all'interno delle membrane neurali ed è un deposito di acidi grassi polinsaturi come il DHA e gli omega-3 e i suoi livelli sono ridotti in molti disturbi neurodegenerativi come il Parkinson, per cui sono stati valutati gli effetti motori di un trattamento giornaliero per 12 giorni, su scimmie lesionate con MPTP, di 100 mg/kg di DHA paragonati a 50 mg/kg di PPI-1011, precursore orale della plasmalogenil-etanolamina e DHA (Gregoire *et al.*, 2015). Il DHA con PPI-1011 hanno alzato i livelli di plasmalogenil-etanolamina senza influenzare quelli di fosfatidil-etanolamina contenente DHA, sia il PPI-1011, con effetto immediato, che il DHA, con effetto più ritardato (10 giorni), hanno ridotto la discinesia e tale riduzione era correlata inversamente all'aumento dei livelli di plasmalogenil-etanolamina. Tale studio suggerisce quindi un potenziale utilizzo terapeutico del precursore di plasmalogenil-etanolamina nella LID dato che la sua somministrazione alle dosi di 10,25 e 50 mg/kg non influenza l'attività anti-Parkinson della levodopa e non causa particolari reazioni avverse.

Il DHA mostra quindi un'efficace attività antidiscinetica sebbene rimanga da investigare se esso è coinvolto nella fisiopatologia della LID o se semplicemente allevia la discinesia modulando la trasmissione glutammatergica o dopaminergica, inoltre i dubbi sul suo potenziale uso clinico risiedono nel fatto che il DHA è una molecola disponibile sul mercato e sicuramente utilizzata da molti pazienti parkinsoniani, ma nessuno di essi ha riportato particolari effetti positivi sulla LID (Huot *et al.*, 2013a).

4.15.4 Esocitosi

L'isoforma A delle glicoproteine 2 della vescicola sinaptica (SV_{2A}), che è coinvolta nell'esocitosi ed è prevalentemente espressa nel sistema nervoso centrale, potrebbe giocare un ruolo nella fisiopatologia della discinesia (Huot *et al.*, 2013a). Il farmaco anticonvulsivante levetiracetam ha un sito di legame a livello cerebrale che è proprio la proteina SV_{2A} e si è osservato che somministrando il farmaco a pazienti affetti da Morbo di Parkinson e che avevano sviluppato discinesia in seguito al trattamento con l-DOPA è stata ottenuta una riduzione dei sintomi discinetici (Tousi and Subramanian, 2005):

- 1) Nel caso 1: un uomo di 60 anni, da 5 anni affetto da Morbo di Parkinson e che presentava discinesia, ha ricevuto levetiracetam partendo da una dose di 125 mg al giorno e dopo 3 mesi, alla dose di 250 mg, il miglioramento dei sintomi della LID da lui riportati era del 90%;
- 2) Nel caso 2: un uomo di 74 anni malato da 15 anni, con episodi discinetici e che era stato operato chirurgicamente al nucleo subtalamico migliorando di poco la LID, ha ricevuto 125 mg al giorno di levetiracetam come dose iniziale e dopo 3 mesi, alla dose

di 250 mg al giorno, ha riportato un miglioramento della LID di circa il 60%;

- 3) Nel caso 3: una donna di 65 anni malata da 5 anni e che riportava discinesie generalizzate, ha ricevuto un trattamento iniziale con 250 mg di levetiracetam riportando un lieve miglioramento della LID, ma poi ha abbandonato il trattamento per l'eccessiva sonnolenza che il farmaco le causava;
- 4) Nel caso 4: un uomo di 60 anni malato di Parkinson da 20 anni e che aveva effettuato una pallidotomia destra 9 anni prima per migliorare la LID, ha ricevuto il levetiracetam con benefici sulla discinesia ma il paziente non ha seguito in modo continuativo il trattamento a causa del costo del levetiracetam.

Il levetiracetam ha quindi mostrato una buona efficacia nel trattamento della LID, soprattutto per i primi due pazienti, mentre per gli altri due il trattamento è stato troppo breve per dare un giudizio effettivo, inoltre il levetiracetam non ha causato particolari effetti avversi, eccetto la sedazione, e non ha peggiorato i sintomi parkinsoniani.

Confrontando gli effetti del levetiracetam (n=17), somministrato, in uno studio a doppio cieco, a dosi comprese tra i 250 e i 2000 mg al giorno, e quelli del placebo (n=15) su un totale di 32 pazienti parkinsoniani, è stato osservato che il farmaco anticonvulsivante ha migliorato, seppur in modo lieve, la discinesia nei pazienti senza peggiorare i sintomi parkinsoniani e senza alterare la risposta alla l-DOPA, essendo ben tollerato, senza particolari reazioni avverse, anche alla dose di 2000 mg al giorno (Wolz *et al.*, 2010).

Il levetiracetam ha inoltre effetti specifici sui livelli striatali di Δ FosB, DARPP-32 e ERK1/2 modulando in parallelo l'espressione della LID, inoltre si lega alle proteina SV_{2A} partecipando all'esocitosi e quindi al rilascio del neurotrasmettitore (Du *et al.*, 2015).

Il Keppra ® , specialità farmaceutica contenente levetiracetam, a dosi fino a 3000 mg al giorno per una terapia di 60 giorni, ha migliorato in modo significativo l' "on time" senza discinesia o con discinesia non invalidante in nove pazienti parkinsoniani (Zesiewicz *et al.*, 2005).

Il levetiracetam non modifica l' onset della discinesia se somministrato de novo con la l-DOPA, il trattamento combinato di l-DOPA e levetiracetam porta a una riduzione del livello di discinesia indotta dal precedente trattamento con la l-DOPA (Hill *et al.*, 2004).

In contrasto con quanto affermato fino ad ora, la somministrazione di levetiracetam, dosaggio massimo 3000 mg al giorno per 2 mesi, in 9 pazienti parkinsoniani malati in media da 13 anni non è stata ben tollerata a causa di un peggioramento dei sintomi parkinsoniani e della comparsa di effetti avversi, come eccessiva sonnolenza che hanno portato i pazienti ad abbandonare lo studio (Lyons and Pahwa, 2006).

La modulazione dell'attività della proteina SV_{2A} appare quindi utile nell'alleviare la discinesia sebbene non siano ancora chiari i meccanismi tramite cui questa azione si esplica, si pensa che modulare tale proteina conduca a un rilascio più fisiologico di dopamina e glutammato nello striato oppure potrebbe semplicemente ridurre il rilascio pulsatile della dopamina (Huot *et al.*, 2013a).

4.15.5 Ormone di rilascio della tireotropina (TRH)

L'iniezione di una singola dose di 10 µg di TRH in ratti anestetizzati ha aumentato del 240% i livelli di dopamina nel fluido extracellulare cerebrale, così come la somministrazione sistemica di tirosina 20 mg/kg ha aumentato del 190% il rilascio di dopamina, mentre la co-somministrazione di TRH e tirosina hanno potenziato molto la risposta alla dopamina, quindi

dosi basse di ormone possono influenzare la trasmissione dopaminergica striatale (Kreutz *et al.*, 1990).

È stato dimostrato che in modelli di ratti parkinsoniani si verifica una up-regulation dell'espressione del TRH nello striato che ha subito la deplezione di dopamina e nelle proiezioni verso il globus pallidus e la substantia nigra, inoltre il potenziamento dell'espressione dell'ormone è stato associato allo sviluppo di complicanze motorie in seguito alla terapia con l-DOPA (Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2010).

È dunque ipotizzabile la presenza di un meccanismo modulatore mediato dal TRH alla base della patologica neuroplasticità che conduce a una iper-responsività alla dopamina nel Morbo di Parkinson (Cantuti-Castelvetri *et al.*, 2010), inoltre secondo il modello classico di organizzazione funzionale dei gangli della base, un aumento del rilascio del GABA mediato dal TRH nel globus pallidus interno e nella pars reticolata della substantia nigra potrebbe inibire le strutture di output dei gangli della base, disinibendo le proiezioni glutammatergiche talamo-corticali con conseguente potenziamento dell'eccitazione corticale (Huot *et al.*, 2013a).

4.15.6 NO sintasi

L'enzima NO sintasi è distribuito in modo ubiquitario nell'organismo ed è studiato principalmente per osservare gli effetti della produzione di NO da lui mediata.

La somministrazione di inibitori dell'NO sintasi (come il 7-NI, 7-nitroindazolo) associati alla l-DOPA riduce la discinesia in ratti lesionati con 6-OHDA attenuando la sovra-espressione della FosB/ Δ FosB nello striato che ha subito deplezione di dopamina, con una singola iniezione di 7-NI 30 minuti prima della l-DOPA (Padovan-Neto *et al.*, 2013).

In uno studio preclinico recente è stato analizzato il potenziale antidiscinetico di un trattamento prolungato con il 7-NI su topi parkinsoniani lesionati con 6-OHDA, osservando l'espressione di neuroni contenenti FosB e Δ FosB in seguito alla somministrazione del 7-NI 30 mg/kg 30 minuti prima della l-DOPA 30 mg/kg (Padovan-Neto *et al.*, 2015). Tale studio ha dimostrato principalmente che:

- 1) la somministrazione giornaliera del 7-NI con la l-DOPA ha diminuito l'incidenza di movimenti discinetici assiali, delle zampe, oro facciali e locomotori, senza interferire con l'attività anti-Parkinson della l-DOPA;
- 2) gli effetti antidiscinetici della somministrazione cronica del 7-NI hanno ridotto l'up-regulation striatale della dopamina e il turnover della serotonina;
- 3) la somministrazione del 7-NI ha prevenuto la sovra-espressione della FosB/ Δ FosB nello striato.

Recentemente è stato dimostrato che lo sviluppo della discinesia indotta da l-DOPA nel ratto è associata all'attivazione di cellule gliali che promuovono l'infiammazione e la somministrazione del 7-NI è molto efficace nel prevenire questo fenomeno, indicando un coinvolgimento dell'NO (Bortolanza *et al.*, 2014). Questo studio è stato condotto su ratti lesionati con 6-OHDA, suddivisi in 4 gruppi sperimentali così trattati per un totale di 21 giorni:

- 1) veicolo + soluzione fisiologica;
- 2) 7-NI + soluzione fisiologica;
- 3) veicolo + l-DOPA;
- 4) 7-NI + l-DOPA.

Dall'esperimento è risultato che gli animali che hanno ricevuto quotidianamente il 7-NI 30 minuti prima della l-DOPA non hanno

sviluppato movimenti discinetici e hanno esibito un'espressione dei markers della neuro infiammazione GFAP e OX-42.

Queste evidenze precliniche suggeriscono che gli inibitori dell' NO sintasi possono rappresentare una valida strategia anti-LID nei pazienti affetti da Parkinson, ma è auspicabile sintetizzare farmaci specifici per l'NO sintasi cerebrale per ridurre gli effetti collaterali su tutti gli altri distretti corporei.

5. CONCLUSIONI

La fisiopatologia della discinesia indotta da l-DOPA è un fenomeno estremamente complesso in cui sono coinvolti molti sistemi biologici e che è continuamente oggetto di studi finalizzati alla scoperta di nuove strategie terapeutiche per migliorare la qualità di vita dei pazienti con Morbo di Parkinson.

La letteratura scientifica ha evidenziato che il principale fattore alla base della LID sembra essere la stimolazione pulsatile, fasica dei recettori della dopamina che aggrava la condizione di denervazione nella quale i neuroni spinosi sono ipersensibili al neurotrasmettitore.

Di fatti è stato dimostrato che terapie con farmaci che stimolano in modo continuo i recettori dopaminergici, mediante una normalizzazione del disequilibrio nei circuiti diretti e indiretti correlato alla malattia di base, portano a un miglioramento della discinesia.

A questo proposito, le strategie terapeutiche attuabili prevedono:

1. l'uso di farmaci agonisti dopaminergici con un'emivita più lunga della levodopa
2. ritardare il più possibile la somministrazione della levodopa utilizzando nelle prima fasi della malattia farmaci dopaminergici
3. farmaci dopaminergici associati alla levodopa per ridurre la dose di quest'ultima

4. dosaggi bassi di levodopa con somministrazioni più frequenti che riducano gli intervalli tra una stimolazione e l'altra

Il sistema glutammatergico si è osservato essere altresì molto importante nello studio dei meccanismi che conducono alla LID, in quanto una iperattività di questo sistema è stata associata allo sviluppo delle complicanze motorie in seguito al trattamento con levodopa.

Dagli studi sopra descritti in questo lavoro di tesi si evince che l'utilizzo di farmaci antagonisti del glutammato, come ad esempio l'amantadina, possano rappresentare una buona strategia terapeutica per la LID.

La LID è però modulata da moltissimi sistemi diversi che offrono quindi diversi target terapeutici su cui agire.

La serotonina è in parte responsabile del rilascio pulsatile di dopamina, che agisce come falso neurotrasmettitore, mediante stimolazione di eterorecettori localizzati sui terminali dopaminergici. Di conseguenza l'intervento a livello dei recettori 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} e 5-HT_{2A}, può alleviare i movimenti discinetici.

Gli SSRI rappresentano un sistema che modula la stimolazione pulsatile dei recettori dopaminergici riuscendo a produrre un miglioramento dei sintomi della LID, senza alterare gli effetti terapeutici della levodopa sul Parkinson. Questi farmaci hanno anche il vantaggio di essere già largamente utilizzati in terapia e quindi ben conosciuti, con un buon profilo di tollerabilità.

Non è ancora chiaro come sistemi quali la trasmissione cannabinoide, istaminergica, oppioide o tachichinergica possano modulare la LID. Gli studi riportati mostrano, ad esempio, che l'analogo endocannabinoide oleoiletanolammide ha effetti anti-discinetici significativi e l'antagonismo dei recettori per l'istamina, H₂, largamente espressi negli interneuroni

colinergici, porta a una riduzione della LID, in quanto nelle discinesie si assiste a un'aumentata attività colinergica.

Nel considerare la fisiopatologia della LID sono importanti anche le modifiche che avvengono a livello delle proteine che attivano determinate cascate di segnali come la DARPP-32 e la ERK1/2.

Lo scenario della discinesia indotta da l-DOPA è dunque altamente complesso e per tale motivo è difficile definirlo in modo completo e trovare un'adeguata strategia terapeutica.

Basandosi su tutti gli studi riportati, l'ipotesi è che una politerapia farmacologica che moduli una buona parte dei sistemi coinvolti e dei circuiti alterati in questa condizione patologica potrebbe essere risolutiva nel trattamento della discinesia indotta da l-DOPA.

La soluzione al problema è quindi sotto costante e attento studio ed è necessario che molecole che risultano positive negli studi preclinici riescano a garantire la stessa efficacia anche negli studi clinici, un successo a questo livello permetterebbe alla ricerca di progredire e di arrivare quanto prima possibile a una valida e definitiva terapia.

Ultimamente si sta anche tentando la strategia non farmacologica della stimolazione profonda e continua di talamo, globus pallidus e subtalomo, con elettrodi, in modo da stabilizzare i circuiti neuronali che sono ipersensibili nella LID, e dunque permettere alle discinesie di regredire.

6. BIBLIOGRAFIA

Alachkar, A., Brotchie, J.M., Jones, O.T., 2012. Changes in the mRNA levels of alpha2A and alpha2C adrenergic receptors in rat models of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of molecular neuroscience* : MN 46, 145-152.

Aminoff, M.J., 2011. Trattamento farmacologico del parkinsonismo e di altri disturbi motori. In: Katzung, B.G., Preziosi, P. (Eds.), *Farmacologia generale e clinica*. Piccin-Nuova Libreria, Padova, pp. 508-526.

Andersson, M., Hilbertson, A., Cenci, M.A., 1999. Striatal fosB expression is causally linked with L-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 6, 461-474.

Anichtchik, O.V., Peitsaro, N., Rinne, J.O., Kalimo, H., Panula, P., 2001. Distribution and modulation of histamine H(3) receptors in basal ganglia and frontal cortex of healthy controls and patients with Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 8, 707-716.

Anichtchik, O.V., Rinne, J.O., Kalimo, H., Panula, P., 2000. An altered histaminergic innervation of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Experimental neurology* 163, 20-30.

Aquino, C.C., Fox, S.H., 2015. Clinical spectrum of levodopa-induced complications. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 30, 80-89.

Azkona, G., Marcilla, I., Lopez de Maturana, R., Sousa, A., Perez-Navarro, E., Luquin, M.R., Sanchez-Pernate, R., 2014. Sustained increase of PKA activity in the postcommissural putamen of dyskinetic monkeys. *Molecular neurobiology* 50, 1131-1141.

Barnum, C.J., Eskow, K.L., Dupre, K., Blandino, P., Jr., Deak, T., Bishop, C., 2008. Exogenous corticosterone reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the hemiparkinsonian rat: role for interleukin-1beta. *Neuroscience* 156, 30-41.

Bennouar, K.E., Uberti, M.A., Melon, C., Bacolod, M.D., Jimenez, H.N., Cajina, M., Kerkerian-Le Goff, L., Doller, D., Gubellini, P., 2013. Synergy between L-DOPA and a novel positive allosteric modulator of metabotropic glutamate receptor 4: implications for Parkinson's disease treatment and dyskinesia. *Neuropharmacology* 66, 158-169.

Berg, D., Godau, J., Trenkwalder, C., Eggert, K., Csoti, I., Storch, A., Huber, H., Morelli-Canelo, M., Stamelou, M., Ries, V., Wolz, M., Schneider, C., Di Paolo, T., Gasparini, F., Hariry, S., Vandemeulebroecke, M., Abi-Saab, W., Cooke, K., Johns, D., Gomez-Mancilla, B., 2011. AFQ056 treatment of levodopa-induced dyskinesias: results of 2 randomized controlled trials. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 26, 1243-1250.

- Berton, O., Guigoni, C., Li, Q., Bioulac, B.H., Aubert, I., Gross, C.E., Dileone, R.J., Nestler, E.J., Bezard, E., 2009. Striatal overexpression of DeltaJunD resets L-DOPA-induced dyskinesia in a primate model of Parkinson disease. *Biological psychiatry* 66, 554-561.
- Bezard, E., Munoz, A., Tronci, E., Pioli, E.Y., Li, Q., Porras, G., Bjorklund, A., Carta, M., 2013. Anti-dyskinetic effect of anpirtoline in animal models of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuroscience research* 77, 242-246.
- Bhide, N., Lindenbach, D., Barnum, C.J., George, J.A., Surrena, M.A., Bishop, C., 2015. Effects of the beta-adrenergic receptor antagonist Propranolol on dyskinesia and L-DOPA-induced striatal DA efflux in the hemi-parkinsonian rat. *Journal of neurochemistry*.
- Bibbiani, F., Oh, J.D., Petzer, J.P., Castagnoli, N., Jr., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., Chase, T.N., 2003. A2A antagonist prevents dopamine agonist-induced motor complications in animal models of Parkinson's disease. *Experimental neurology* 184, 285-294.
- Billet, F., Costentin, J., Dourmap, N., 2012. Influence of corticostriatal delta-opioid receptors on abnormal involuntary movements induced by L-DOPA in hemiparkinsonian rats. *Experimental neurology* 236, 339-350.
- Billet, F., Costentin, J., Dourmap, N., 2007. Influence of glial cells in the dopamine releasing effect resulting from the stimulation of striatal delta-opioid receptors. *Neuroscience*, 150, 131–143.
- Billet, F., Dourmap, N., Costentin, J., 2004. Involvement of corticostriatal glutamatergic terminals in striatal dopamine release elicited by stimulation of delta-opioid receptors. *The European journal of neuroscience* 20, 2629-2638.
- Bishop, C., George, J.A., Buchta, W., Goldenberg, A.A., Mohamed, M., Dickinson, S.O., Eissa, S., Eskow Jaunarajs, K.L., 2012. Serotonin transporter inhibition attenuates l-DOPA-induced dyskinesia without compromising l-DOPA efficacy in hemi-parkinsonian rats. *The European journal of neuroscience* 36, 2839-2848.
- Blanchet, P.J., Allard, P., Gregoire, L., Tardif, F., Bedard, P.J., 1996. Risk factors for peak dose dyskinesia in 100 levodopa-treated parkinsonian patients. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 23, 189-193.
- Blandini, F., 2003. Adenosine receptors and L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: potential targets for a new therapeutic approach. *Experimental neurology* 184, 556-560.
- Bortolanza, M., Cavalcanti-Kiwiatkoski, R., Padovan-Neto, F.E., da-Silva, C.A., Mitkovski, M., Raisman-Vozari, R., Del-Bel, E., 2014. Glial activation is associated with l-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease* 73C, 377-387.

- Bourdenx, M., Nilsson, A., Wadensten, H., Falth, M., Li, Q., Crossman, A.R., Andren, P.E., Bezard, E., 2014. Abnormal structure-specific peptide transmission and processing in a primate model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiology of disease* 62, 307-312.
- Bove, J., Serrats, J., Mengod, G., Cortes, R., Aguilar, E., Marin, C., 2006. Reversion of levodopa-induced motor fluctuations by the A2A antagonist CSC is associated with an increase in striatal preprodynorphin mRNA expression in 6-OHDA-lesioned rats. *Synapse (New York, N.Y.)* 59, 435-444.
- Buck, K., Ferger, B., 2009. Comparison of intrastriatal administration of noradrenaline and L-DOPA on dyskinetic movements: a bilateral reverse in vivo microdialysis study in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience* 159, 16-20.
- Buck, K., Ferger, B., 2010. The selective alpha1 adrenoceptor antagonist HEAT reduces L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Synapse (New York, N.Y.)* 64, 117-126.
- Calon, F., Di Paolo, T., 2002. Levodopa response motor complications--GABA receptors and preproenkephalin expression in human brain. *Parkinsonism & related disorders* 8, 449-454.
- Cantuti-Castelvetri, I., Hernandez, L.F., Keller-McGandy, C.E., Kett, L.R., Landy, A., Hollingsworth, Z.R., Saka, E., Crittenden, J.R., Nillni, E.A., Young, A.B., Standaert, D.G., Graybiel, A.M., 2010. Levodopa-induced dyskinesia is associated with increased thyrotropin releasing hormone in the dorsal striatum of hemi-parkinsonian rats. *PloS one* 5, e13861.
- Cao, X., Liang, L., Hadcock, J.R., Iredale, P.A., Griffith, D.A., Menniti, F.S., Factor, S., Greenamyre, J.T., Papa, S.M., 2007. Blockade of cannabinoid type 1 receptors augments the antiparkinsonian action of levodopa without affecting dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated rhesus monkeys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 323, 318-326.
- Cao, X., Yasuda, T., Uthayathas, S., Watts, R.L., Mouradian, M.M., Mochizuki, H., Papa, S.M., 2010. Striatal overexpression of DeltaFosB reproduces chronic levodopa-induced involuntary movements. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 7335-7343.
- Carta, M., Carlsson, T., Kirik, D., Bjorklund, A., 2007. Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain : a journal of neurology* 130, 1819-1833.
- Cenci, M.A., 2002. Transcription factors involved in the pathogenesis of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Amino acids* 23, 105-109.
- Chen, L., Togasaki, D.M., Langston, J.W., Di Monte, D.A., Quik, M., 2005. Enhanced striatal opioid receptor-mediated G-protein activation in L-DOPA-treated dyskinetic monkeys. *Neuroscience* 132, 409-420.

Chen, Y.Y., Sy, H.N., Wu, S.L., 2008. Zolpidem improves akinesia, dystonia and dyskinesia in advanced Parkinson's disease. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 15, 955-956.

Cheshire, P., Ayton, S., Bertram, K.L., Ling, H., Li, A., McLean, C., Halliday, G.M., O'Sullivan, S.S., Revesz, T., Finkelstein, D.I., Storey, E., Williams, D.R., 2015. Serotonergic markers in Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesias. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*.

Cote, S.R., Kuzhikandathil, E.V., 2015. Chronic levodopa treatment alters expression and function of dopamine D3 receptor in the MPTP/p mouse model of Parkinson's disease. *Neuroscience letters* 585, 33-37.

Cox, H., Togasaki, D.M., Chen, L., Langston, J.W., Di Monte, D.A., Quik, M., 2007. The selective kappa-opioid receptor agonist U50,488 reduces L-dopa-induced dyskinesias but worsens parkinsonism in MPTP-treated primates. *Experimental neurology* 205, 101-107.

Cui, G., Yang, X., Wang, X., Zhang, Z., Yue, X., Shi, H., Shen, X., 2014. Ranitidine reduced levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropsychiatric disease and treatment* 10, 39-46.

Dekundy, A., Lundblad, M., Danysz, W., Cenci, M.A., 2007. Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. *Behavioural brain research* 179, 76-89.

Di Paolo, T., Gregoire, L., Feuerbach, D., Elbast, W., Weiss, M., Gomez-Mancilla, B., 2014. AQW051, a novel and selective nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ partial agonist, reduces l-Dopa-induced dyskinesias and extends the duration of l-Dopa effects in parkinsonian monkeys. *Parkinsonism & related disorders* 20, 1119-1123.

Ding, Y., Won, L., Britt, J.P., Lim, S.A., McGehee, D.S., Kang, U.J., 2011. Enhanced striatal cholinergic neuronal activity mediates L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 840-845.

Du, H., Nie, S., Chen, G., Ma, K., Xu, Y., Zhang, Z., Papa, S.M., Cao, X., 2015. Levetiracetam Ameliorates L-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Rats Inducing Critical Molecular Changes in the Striatum. *Parkinsons Dis* 2015, 253878.

Durif, F., Debilly, B., Galitzky, M., Morand, D., Viallet, F., Borg, M., Thobois, S., Broussolle, E., Rascol, O., 2004. Clozapine improves dyskinesias in Parkinson disease: a double-blind, placebo-controlled study. *Neurology* 62, 381-388.

Evans, J.R., Mason, S.L., Williams-Gray, C.H., Foltynie, T., Brayne, C., Robbins, T.W., Barker, R.A., 2011. The natural history of treated Parkinson's disease in an incident, community based cohort. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 82, 1112-1118.

Fox, S.H., Henry, B., Hill, M., Crossman, A., Brotchie, J., 2002. Stimulation of cannabinoid receptors reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 17, 1180-1187.

Gerlach, M., Halley, P., Riederer, P., van den Buuse, M., 2013. The effect of piribedil on L-DOPA-induced dyskinesias in a rat model of Parkinson's disease: differential role of alpha(2) adrenergic mechanisms. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 120, 31-36.

Gesi, M., Ferrucci, M., Ghelarducci, I., 2007. *Anatomia del corpo umano*. CLD Libri, Pontedera.

Gomez-Ramirez, J., Johnston, T.H., Visanji, N.P., Fox, S.H., Brotchie, J.M., 2006. Histamine H3 receptor agonists reduce L-dopa-induced chorea, but not dystonia, in the MPTP-lesioned nonhuman primate model of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 21, 839-846.

Gonzalez-Aparicio, R., Moratalla, R., 2014. Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson s disease. *Neurobiology of disease* 62, 416-425.

Gregoire, L., Morin, N., Ouattara, B., Gasparini, F., Bilbe, G., Johns, D., Vranesic, I., Sahasranaman, S., Gomez-Mancilla, B., Di Paolo, T., 2011. The acute antiparkinsonian and antidyskinetic effect of AFQ056, a novel metabotropic glutamate receptor type 5 antagonist, in L-Dopa-treated parkinsonian monkeys. *Parkinsonism & related disorders* 17, 270-276.

Gregoire, L., Smith, T., Senanayake, V., Mochizuki, A., Miville-Godbout, E., Goodenowe, D., Di Paolo, T., 2015. Plasmalogen precursor analog treatment reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Behavioural brain research* 286, 328-337.

Grondin, R., Hadj Tahar, A., Doan, V.D., Ladure, P., Bedard, P.J., 2000. Noradrenoceptor antagonism with idazoxan improves L-dopa-induced dyskinesias in MPTP monkeys. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 361, 181-186.

Gutierrez-Valdez, A.L., Garcia-Ruiz, R., Anaya-Martinez, V., Torres-Esquivel, C., Espinosa-Villanueva, J., Reynoso-Erazo, L., Tron-Alvarez, R., Aley-Medina, P., Sanchez-Betancourt, J., Montiel-Flores, E., Avila-Costa, M.R., 2013. The combination of oral L-DOPA/rimonabant for effective dyskinesia treatment and cytological preservation in a rat model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *Behavioural pharmacology* 24, 640-652.

Hanrieder, J., Ljungdahl, A., Falth, M., Mammo, S.E., Bergquist, J., Andersson, M., 2011. L-DOPA-induced dyskinesia is associated with regional increase of striatal dynorphin peptides as elucidated by imaging mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, M111 009308.

Hauser, R.A., Shulman, L.M., Trugman, J.M., Roberts, J.W., Mori, A., Ballerini, R., Sussman, N.M., 2008. Study of istradefylline in patients with Parkinson's disease on levodopa with motor fluctuations. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 23, 2177-2185.

Hely, M.A., Morris, J.G., Reid, W.G., Trafficante, R., 2005. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-dopa-responsive problems dominate at 15 years. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 20, 190-199.

Hill, M.P., Brotchie, J.M., Crossman, A.R., Bezard, E., Michel, A., Grimee, R., Klitgaard, H., 2004. Levetiracetam Interferes With the L-dopa priming process in MPTP-lesioned drug-naïve marmosets. *Clinical neuropharmacology* 27, 171-177.

Hodgson, R.A., Bedard, P.J., Varty, G.B., Kazdoba, T.M., Di Paolo, T., Grzelak, M.E., Pond, A.J., Hadjtahar, A., Belanger, N., Gregoire, L., Dare, A., Neustadt, B.R., Stamford, A.W., Hunter, J.C., 2010. Preladenant, a selective A(2A) receptor antagonist, is active in primate models of movement disorders. *Experimental neurology* 225, 384-390.

Huot, P., 2015. L-DOPA-induced dyskinesia, is striatal dopamine depletion a requisite? *Journal of the neurological sciences* 351, 9-12.

Huot, P., Johnston, T.H., Koprach, J.B., Fox, S.H., Brotchie, J.M., 2013a. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacological reviews* 65, 171-222.

Huot, P., Johnston, T.H., Snoeren, T., Koprach, J.B., Hill, M.P., Fox, S.H., Brotchie, J.M., 2013b. Use of catechol-O-methyltransferase inhibition to minimize L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque. *The European journal of neuroscience* 37, 831-838.

Iderberg, H., Maslava, N., Thompson, A.D., Bubser, M., Niswender, C.M., Hopkins, C.R., Lindsley, C.W., Conn, P.J., Jones, C.K., Cenci, M.A., 2015a. Pharmacological stimulation of metabotropic glutamate receptor type 4 in a rat model of Parkinson's disease and l-DOPA-induced dyskinesia: Comparison between a positive allosteric modulator and an orthosteric agonist. *Neuropharmacology* 95, 121-129.

Iderberg, H., McCreary, A.C., Varney, M.A., Cenci, M.A., Newman-Tancredi, A., 2015b. Activity of serotonin 5-HT1A receptor 'biased agonists' in rat models of Parkinson's disease and l-DOPA-induced dyskinesia. *Neuropharmacology* 93, 52-67.

Iderberg, H., Rylander, D., Bimpisidis, Z., Cenci, M.A., 2013. Modulating mGluR5 and 5-HT1A/1B receptors to treat l-DOPA-induced dyskinesia: effects of combined treatment and possible mechanisms of action. *Experimental neurology* 250, 116-124.

Ikeda, K., Yoshikawa, S., Kurokawa, T., Yuzawa, N., Nakao, K., Mochizuki, H., 2009. TRK-820, a selective kappa opioid receptor agonist, could effectively ameliorate L-DOPA-induced dyskinesia symptoms in a rat model of Parkinson's disease. *European journal of pharmacology* 620, 42-48.

Jaeschke, G., Kolczewski, S., Spooren, W., Vieira, E., Bitter-Stoll, N., Boissin, P., Borroni, E., Buttelmann, B., Ceccarelli, S., Clemann, N., David, B., Funk, C., Guba, W., Harrison, A., Hartung, T., Honer, M., Huwyler, J., Kuratli, M., Niederhauser, U., Pahler, A., Peters, J.U., Petersen, A., Prinssen, E., Ricci, A., Rueher, D., Rueher, M., Schneider, M., Spurr, P., Stoll, T., Tannler, D., Wichmann, J., Porter, R.H., Wettstein, J.G., Lindemann, L., 2015. Metabotropic Glutamate Receptor 5 Negative Allosteric Modulators: Discovery of 2-Chloro-4-[1-(4-fluorophenyl)-2,5-dimethyl-1H-imidazol-4-ylethynyl]pyridine (Basimglurant, RO4917523), a Promising Novel Medicine for Psychiatric Diseases. *Journal of medicinal chemistry* 58, 1358-1371.

Jenner, P., 2013. A cup of coffee a day keeps dyskinesia away? *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28, 265-267.

Johnston, T.H., Huot, P., Fox, S.H., Koprach, J.B., Szeliga, K.T., James, J.W., Graef, J.D., Letchworth, S.R., Jordan, K.G., Hill, M.P., Brotchie, J.M., 2013. TC-8831, a nicotinic acetylcholine receptor agonist, reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the MPTP macaque. *Neuropharmacology* 73, 337-347.

Johnston, T.H., van der Meij, A., Brotchie, J.M., Fox, S.H., 2010. Effect of histamine H2 receptor antagonism on levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-macaque model of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 25, 1379-1390.

Jones, N., Bleickardt, C., Mullins, D., Parker, E., Hodgson, R., 2013. A2A receptor antagonists do not induce dyskinesias in drug-naïve or L-dopa sensitized rats. *Brain research bulletin* 98, 163-169.

Julien, C., Berthiaume, L., Hadj-Tahar, A., Rajput, A.H., Bedard, P.J., Di Paolo, T., Julien, P., Calon, F., 2006. Postmortem brain fatty acid profile of levodopa-treated Parkinson disease patients and parkinsonian monkeys. *Neurochemistry international* 48, 404-414.

Kelsey, J.E., Neville, C., 2014. The effects of the beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, on forepaw stepping and L-DOPA-induced dyskinesia in a rodent model of Parkinson's disease. *Psychopharmacology* 231, 2405-2415.

Ko, W.K., Pioli, E., Li, Q., McGuire, S., Dufour, A., Sherer, T.B., Bezard, E., Facheris, M.F., 2014. Combined fenobam and amantadine treatment promotes robust antidyskinetic effects in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 29, 772-779.

Kobylecki, C., Burn, D.J., Kass-Iliyya, L., Kellett, M.W., Crossman, A.R., Silverdale, M.A., 2014. Randomized clinical trial of topiramate for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 20, 452-455.

Kobylecki, C., Cenci, M.A., Crossman, A.R., Ravenscroft, P., 2010. Calcium-permeable AMPA receptors are involved in the induction and expression of l-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 114, 499-511.

- Kobylecki, C., Crossman, A.R., Ravenscroft, P., 2013. Alternative splicing of AMPA receptor subunits in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. *Experimental neurology* 247, 476-484.
- Koppel, B.S., Brust, J.C., Fife, T., Bronstein, J., Youssof, S., Gronseth, G., Gloss, D., 2014. Systematic review: efficacy and safety of medical marijuana in selected neurologic disorders: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 82, 1556-1563.
- Kreutz, M.R., Acworth, I.N., Lehnert, H., Wurtman, R.J., 1990. Systemic administration of thyrotropin-releasing hormone enhances striatal dopamine release in vivo. *Brain research* 536, 347-352.
- Kuan, W.L., Zhao, J.W., Barker, R.A., 2008. The role of anxiety in the development of levodopa-induced dyskinesias in an animal model of Parkinson's disease, and the effect of chronic treatment with the selective serotonin reuptake inhibitor citalopram. *Psychopharmacology* 197, 279-293.
- Lewitt, P.A., Hauser, R.A., Lu, M., Nicholas, A.P., Weiner, W., Coppard, N., Leinonen, M., Savola, J.M., 2012. Randomized clinical trial of fipamezole for dyskinesia in Parkinson disease (FJORD study). *Neurology* 79, 163-169.
- Li, L., Zhou, F.M., 2013. Parallel dopamine D1 receptor activity dependence of l-Dopa-induced normal movement and dyskinesia in mice. *Neuroscience* 236, 66-76.
- Lim, S.A., Xia, R., Ding, Y., Won, L., Ray, W.J., Hitchcock, S.A., McGehee, D.S., Kang, U.J., 2015. Enhanced histamine H2 excitation of striatal cholinergic interneurons in l-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiology of disease* 76, 67-76.
- Lindenbach, D., Ostock, C.Y., Eskow Jaunarajs, K.L., Dupre, K.B., Barnum, C.J., Bhide, N., Bishop, C., 2011. Behavioral and cellular modulation of L-DOPA-induced dyskinesia by beta-adrenoceptor blockade in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 337, 755-765.
- Liu, X.Y., Mao, L.M., Zhang, G.C., Papasian, C.J., Fibuch, E.E., Lan, H.X., Zhou, H.F., Xu, M., Wang, J.Q., 2009. Activity-dependent modulation of limbic dopamine D3 receptors by CaMKII. *Neuron* 61, 425-438.
- Ljungdahl, A., Hanrieder, J., Falth, M., Bergquist, J., Andersson, M., 2011. Imaging mass spectrometry reveals elevated nigral levels of dynorphin neuropeptides in L-DOPA-induced dyskinesia in rat model of Parkinson's disease. *PloS one* 6, e25653.
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., Cenci, M.A., 2002. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *The European journal of neuroscience* 15, 120-132.
- Lundblad, M., Vaudano, E., Cenci, M.A., 2003. Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of neurochemistry* 84, 1398-1410.

Lyons, K.E., Pahwa, R., 2006. Efficacy and tolerability of levetiracetam in Parkinson disease patients with levodopa-induced dyskinesia. *Clinical neuropharmacology* 29, 148-153.

Marti, M., Rodi, D., Li, Q., Guerrini, R., Fasano, S., Morella, I., Tozzi, A., Brambilla, R., Calabresi, P., Simonato, M., Bezard, E., Morari, M., 2012. Nociceptin/orphanin FQ receptor agonists attenuate L-DOPA-induced dyskinesias. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 16106-16119.

Marti, M., Sarubbo, S., Latini, F., Cavallo, M., Eleopra, R., Biguzzi, S., Lettieri, C., Conti, C., Simonato, M., Zucchini, S., Quatrone, R., Sensi, M., Candeletti, S., Romualdi, P., Morari, M., 2010. Brain interstitial nociceptin/orphanin FQ levels are elevated in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 25, 1723-1732.

Martinez, A., Macheda, T., Morgese, M.G., Trabace, L., Giuffrida, A., 2012. The cannabinoid agonist WIN55212-2 decreases L-DOPA-induced PKA activation and dyskinetic behavior in 6-OHDA-treated rats. *Neuroscience research* 72, 236-242.

Martinez, A.A., Morgese, M.G., Pisanu, A., Macheda, T., Paquette, M.A., Seillier, A., Cassano, T., Carta, A.R., Giuffrida, A., 2015. Activation of PPAR gamma receptors reduces levodopa-induced dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. *Neurobiology of disease* 74, 295-304.

Mazzucchi, S., Frosini, D., Ripoli, A., Nicoletti, V., Linsalata, G., Bonuccelli, U., Ceravolo, R., 2014. Serotonergic antidepressant drugs and L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Acta neurologica Scandinavica*.

Meco, G., Stirpe, P., Edito, F., Purcaro, C., Valente, M., Bernardi, S., Vanacore, N., 2009. Aripiprazole in L-dopa-induced dyskinesias: a one-year open-label pilot study. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 116, 881-884.

Morgese, M.G., Cassano, T., Cuomo, V., Giuffrida, A., 2007. Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB(1) and TRPV1 receptors. *Experimental neurology* 208, 110-119.

Munoz, A., Garrido-Gil, P., Dominguez-Mejide, A., Labandeira-Garcia, J.L., 2014. Angiotensin type 1 receptor blockade reduces l-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta. *Experimental neurology* 261, 720-732.

Murata, M., Hasegawa, K., Kanazawa, I., 2007. Zonisamide improves motor function in Parkinson disease: a randomized, double-blind study. *Neurology* 68, 45-50.

Nicholas, A.P., Buck, K., Ferger, B., 2008. Effects of levodopa on striatal monoamines in mice with levodopa-induced hyperactivity. *Neuroscience letters* 443, 204-208.

Oh, J.D., Bibbiani, F., Chase, T.N., 2002. Quetiapine attenuates levodopa-induced motor complications in rodent and primate parkinsonian models. *Experimental neurology* 177, 557-564.

Padovan-Neto, F.E., Cavalcanti-Kiwiatkoviski, R., Carolino, R.O., Anselmo-Franci, J., Del Bel, E., 2015. Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuropharmacology* 89, 87-99.

Padovan-Neto, F.E., Ferreira, N.R., de Oliveira-Tavares, D., de Aguiar, D., da Silva, C.A., Raisman-Vozari, R., Del Bel, E., 2013. Anti-dyskinetic effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor is linked to decrease of FosB/deltaFosB expression. *Neuroscience letters* 541, 126-131.

Pahwa, R., Tanner, C.M., Hauser, R.A., Sethi, K., Isaacson, S., Truong, D., Struck, L., Ruby, A.E., McClure, N.L., Went, G.T., Stempien, M.J., 2015. Amantadine extended release for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease (EASED Study). *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*.

Politis, M., Wu, K., Loane, C., Brooks, D.J., Kiferle, L., Turkheimer, F.E., Bain, P., Molloy, S., Piccini, P., 2014. Serotonergic mechanisms responsible for levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease patients. *The Journal of clinical investigation* 124, 1340-1349.

Potts, L.F., Park, E.S., Woo, J.M., Dyavar Shetty, B.L., Singh, A., Braithwaite, S.P., Voronkov, M., Papa, S.M., Mouradian, M.M., 2015. Dual kappa-agonist/mu-antagonist opioid receptor modulation reduces levodopa-induced dyskinesia and corrects dysregulated striatal changes in the nonhuman primate model of Parkinson disease. *Annals of neurology*.

Quik, M., Campos, C., Bordia, T., Strachan, J.P., Zhang, J., McIntosh, J.M., Letchworth, S., Jordan, K., 2013a. $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic receptors play a role in the nAChR-mediated decline in L-dopa-induced dyskinesias in parkinsonian rats. *Neuropharmacology* 71, 191-203.

Quik, M., Cox, H., Parameswaran, N., O'Leary, K., Langston, J.W., Di Monte, D., 2007. Nicotine reduces levodopa-induced dyskinesias in lesioned monkeys. *Annals of neurology* 62, 588-596.

Quik, M., Mallela, A., Chin, M., McIntosh, J.M., Perez, X.A., Bordia, T., 2013b. Nicotine-mediated improvement in L-dopa-induced dyskinesias in MPTP-lesioned monkeys is dependent on dopamine nerve terminal function. *Neurobiology of disease* 50, 30-41.

Rascol, O., Arnulf, I., Peyro-Saint Paul, H., Brefel-Courbon, C., Vidailhet, M., Thalamas, C., Bonnet, A.M., Descombes, S., Bejjani, B., Fabre, N., Montastruc, J.L., Agid, Y., 2001. Idazoxan, an α -2 antagonist, and L-DOPA-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 16, 708-713.

Rascol, O., Ferreira, J., Negre-Pages, L., Perez-Lloret, S., Lacomblez, L., Galitzky, M., Lemarie, J.C., Corvol, J.C., Brochie, J.M., Bossi, L., 2012. A proof-of-concept, randomized, placebo-controlled, multiple cross-overs (n-of-1) study of naftazone in Parkinson's disease. *Fundam Clin Pharmacol* 26, 557-564.

- Rascol, O., Fox, S., Gasparini, F., Kenney, C., Di Paolo, T., Gomez-Mancilla, B., 2014. Use of metabotropic glutamate 5-receptor antagonists for treatment of levodopa-induced dyskinesias. *Parkinsonism & related disorders* 20, 947-956.
- Riahi, G., Morissette, M., Parent, M., Di Paolo, T., 2011. Brain 5-HT(2A) receptors in MPTP monkeys and levodopa-induced dyskinesias. *The European journal of neuroscience* 33, 1823-1831.
- Rinne, J.O., Anichtchik, O.V., Eriksson, K.S., Kaslin, J., Tuomisto, L., Kalimo, H., Roytta, M., Panula, P., 2002. Increased brain histamine levels in Parkinson's disease but not in multiple system atrophy. *Journal of neurochemistry* 81, 954-960.
- Roberts, C., 2006. ACP-103, a 5-HT_{2A} receptor inverse agonist. *Curr Opin Investig Drugs* 7, 653-660.
- Ruzicka, E., Roth, J., Jech, R., Busek, P., 2000. Subhypnotic doses of zolpidem oppose dopaminergic-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 15, 734-735.
- Samadi, P., Gregoire, L., Rouillard, C., Bedard, P.J., Di Paolo, T., Levesque, D., 2006. Docosahexaenoic acid reduces levodopa-induced dyskinesias in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine monkeys. *Annals of neurology* 59, 282-288.
- Samadi, P., Morissette, M., Calon, F., Hadj Tahar, A., Dridi, M., Belanger, N., Meltzer, L.T., Bedard, P.J., Di Paolo, T., 2008. Normalization of GABAA receptor specific binding in the substantia nigra reticulata and the prevention of L-dopa-induced dyskinesias in MPTP parkinsonian monkeys. *Synapse (New York, N.Y.)* 62, 101-109.
- Santini, E., Heiman, M., Greengard, P., Valjent, E., Fisone, G., 2009. Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. *Science signaling* 2, ra36.
- Savola, J.M., Hill, M., Engstrom, M., Merivuori, H., Wurster, S., McGuire, S.G., Fox, S.H., Crossman, A.R., Brotchie, J.M., 2003. Fipamezole (JP-1730) is a potent alpha₂ adrenergic receptor antagonist that reduces levodopa-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 18, 872-883.
- Segovia, G., Mora, F., Crossman, A.R., Brotchie, J.M., 2003. Effects of CB1 cannabinoid receptor modulating compounds on the hyperkinesia induced by high-dose levodopa in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 18, 138-149.
- Sharma, S., Singh, S., Sharma, V., Singh, V.P., Deshmukh, R., 2015. Neurobiology of L-DOPA induced dyskinesia and the novel therapeutic strategies. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 70, 283-293.
- Shin, E., Rogers, J.T., Devoto, P., Bjorklund, A., Carta, M., 2014. Noradrenaline neuron degeneration contributes to motor impairments and development of L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology* 257, 25-38.

Sieradzan, K.A., Fox, S.H., Hill, M., Dick, J.P., Crossman, A.R., Brochie, J.M., 2001. Cannabinoids reduce levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. *Neurology* 57, 2108-2111.

Smith, R., Wu, K., Hart, T., Loane, C., Brooks, D.J., Bjorklund, A., Odin, P., Piccini, P., Politis, M., 2015. The role of pallidal serotonergic function in Parkinson's disease dyskinesias: a positron emission tomography study. *Neurobiology of aging* 36, 1736-1742.

Stocchi, F., Rascol, O., Destee, A., Hattori, N., Hauser, R.A., Lang, A.E., Poewe, W., Stacy, M., Tolosa, E., Gao, H., Nagel, J., Merschhemke, M., Graf, A., Kenney, C., Trenkwalder, C., 2013. AFQ056 in Parkinson patients with levodopa-induced dyskinesia: 13-week, randomized, dose-finding study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 28, 1838-1846.

Svenningsson, P., Rosenblad, C., Af Edholm Arvidsson, K., Wictorin, K., Keywood, C., Shankar, B., Lowe, D.A., Bjorklund, A., Widner, H., 2015. Eltoprazine counteracts L-DOPA-induced dyskinesias in Parkinson's disease: a dose-finding study. *Brain : a journal of neurology* 138, 963-973.

Tamim, M.K., Samadi, P., Morissette, M., Gregoire, L., Ouattara, B., Levesque, D., Rouillard, C., Di Paolo, T., 2010. Effect of non-dopaminergic drug treatment on Levodopa induced dyskinesias in MPTP monkeys: common implication of striatal neuropeptides. *Neuropharmacology* 58, 286-296.

Tani, Y., Ogata, A., Koyama, M., Inoue, T., 2010. Effects of piclozotan (SUN N4057), a partial serotonin 1A receptor agonist, on motor complications induced by repeated administration of levodopa in parkinsonian rats. *European journal of pharmacology* 649, 218-223.

Teng, L., Hong, F., Zhang, C., He, J., Wang, H., 2014. Compound Formula Rehmannia alleviates levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Neural regeneration research* 9, 407-412.

Thornton, E., Hassall, M.M., Corrigan, F., Vink, R., 2014. The NK1 receptor antagonist N-acetyl-L-tryptophan reduces dyskinesia in a hemi-parkinsonian rodent model. *Parkinsonism & related disorders* 20, 508-513.

Tison, F., Negre-Pages, L., Meissner, W.G., Dupouy, S., Li, Q., Thiolat, M.L., Thiollier, T., Galitzky, M., Ory-Magne, F., Milhet, A., Marquie, L., Spampinato, U., Rascol, O., Bezard, E., 2013. Simvastatin decreases levodopa-induced dyskinesia in monkeys, but not in a randomized, placebo-controlled, multiple cross-over ("n-of-1") exploratory trial of simvastatin against levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease patients. *Parkinsonism & related disorders* 19, 416-421.

Tousi, B., Subramanian, T., 2005. The effect of levetiracetam on levodopa induced dyskinesia in patients with Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 11, 333-334.

Tronci, E., Lisci, C., Stancampiano, R., Fidalgo, C., Collu, M., Devoto, P., Carta, M., 2013. 5-Hydroxy-tryptophan for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia in the rat Parkinson's disease model. *Neurobiology of disease* 60, 108-114.

Turjanski, N., Lees, A.J., 1992. Gamma vinyl GABA in the treatment of levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 55, 413.

Uchida, S., Tashiro, T., Kawai-Uchida, M., Mori, A., Jenner, P., Kanda, T., 2014. Adenosine A(2)A-receptor antagonist istradefylline enhances the motor response of L-DOPA without worsening dyskinesia in MPTP-treated common marmosets. *Journal of pharmacological sciences* 124, 480-485.

van der Stelt, M., Fox, S.H., Hill, M., Crossman, A.R., Petrosino, S., Di Marzo, V., Brotchie, J.M., 2005. A role for endocannabinoids in the generation of parkinsonism and levodopa-induced dyskinesia in MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1140-1142.

Walsh, S., Gorman, A.M., Finn, D.P., Dowd, E., 2010. The effects of cannabinoid drugs on abnormal involuntary movements in dyskinetic and non-dyskinetic 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain research* 1363, 40-48.

Watts, R.L., Lyons, K.E., Pahwa, R., Sethi, K., Stern, M., Hauser, R.A., Olanow, W., Gray, A.M., Adams, B., Earl, N.L., 2010. Onset of dyskinesia with adjunct ropinirole prolonged-release or additional levodopa in early Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 25, 858-866.

Wolz, M., Lohle, M., Strecker, K., Schwanebeck, U., Schneider, C., Reichmann, H., Grahlert, X., Schwarz, J., Storch, A., 2010. Levetiracetam for levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 117, 1279-1286.

Won, L., Ding, Y., Singh, P., Kang, U.J., 2014. Striatal cholinergic cell ablation attenuates L-DOPA induced dyskinesia in Parkinsonian mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34, 3090-3094.

Xiao, D., Bastia, E., Xu, Y.H., Benn, C.L., Cha, J.H., Peterson, T.S., Chen, J.F., Schwarzschild, M.A., 2006. Forebrain adenosine A2A receptors contribute to L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 13548-13555.

Xiao, D., Cassin, J.J., Healy, B., Burdett, T.C., Chen, J.F., Fredholm, B.B., Schwarzschild, M.A., 2011. Deletion of adenosine A(1) or A((2)A) receptors reduces L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia in a model of Parkinson's disease. *Brain research* 1367, 310-318.

Zesiewicz, T.A., Sullivan, K.L., Maldonado, J.L., Tatum, W.O., Hauser, R.A., 2005. Open-label pilot study of levetiracetam (Keppra) for the treatment of levodopa-induced

dyskinesias in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 20, 1205-1209.

Zhang, D., Bordia, T., McGregor, M., McIntosh, J.M., Decker, M.W., Quik, M., 2014a. ABT-089 and ABT-894 reduce levodopa-induced dyskinesias in a monkey model of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 29, 508-517.

Zhang, D., Mallela, A., Sohn, D., Carroll, F.I., Bencherif, M., Letchworth, S., Quik, M., 2013. Nicotinic receptor agonists reduce L-DOPA-induced dyskinesias in a monkey model of Parkinson's disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 347, 225-234.

Zhang, D., McGregor, M., Decker, M.W., Quik, M., 2014b. The $\alpha 7$ nicotinic receptor agonist ABT-107 decreases L-Dopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 351, 25-32.

Zhang, X., Andren, P.E., Chergui, K., Svenningsson, P., 2008. Neurokinin B/NK3 receptors exert feedback inhibition on L-DOPA actions in the 6-OHDA lesion rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 54, 1143-1152.

Zhao, R., Lu, W., Fang, X., Guo, L., Yang, Z., Ye, N., Zhao, J., Liu, Z., Jia, J., Zheng, L., Zhao, B., Zhang, A., Zhen, X., 2014. (6aR)-11-amino-N-propyl-noraporphine, a new dopamine D2 and serotonin 5-HT1A dual agonist, elicits potent antiparkinsonian action and attenuates levodopa-induced dyskinesia in a 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 124, 204-210.

RINGRAZIAMENTI

Giunta finalmente al tanto desiderato traguardo, vorrei ringraziare tutte le persone che mi sono sempre state vicine.

Ringrazio dunque i mie genitori, Pietro e Carla, per avermi insegnato fin da piccola il valore e l'importanza dello studio e per essere stati per me sempre un esempio e un modello a cui ispirarmi in tutta la mia carriera da studentessa. Il vostro costante appoggio e la vostra fiducia in me sono stati da stimolo per raggiungere tutti i mie obiettivi.

Grazie ai mie nonni, Adua, Cesare, Nino e Rosa che mi hanno trasmesso il valore del lavoro e del sacrificio e anche se lontani, sono sempre nel mio cuore.

Grazie ai miei zii per avermi sempre sostenuto nel mio percorso.

Grazie a mia cugina Lucia che è per me come una sorella, siamo lontane ma il sangue che ci unisce ci rende sempre vicine.

Un ringraziamento particolare va a Lorenzo, il mio ragazzo, che mi sostiene sempre in tutto quello che faccio e che con il suo amore mi dà la forza e la vitalità necessarie per affrontare ogni situazione. Questa tesi la dedico anche a lui perché è un piccolo grande passo verso il nostro futuro insieme.

Grazie a Daniela e Giuliano che mi hanno dato una seconda famiglia a cui appoggiarmi e che mi hanno voluto bene fin dal primo giorno in cui mi hanno incontrato.

Grazie ai miei amici di sempre che mi hanno accompagnato in tutto il mio percorso di studi e di crescita e che sono delle persone su cui posso sempre contare.

Grazie alle mie “ zie di Viareggio ” e a “ nonna Teresa ” che fin da quando ero talmente piccola da non averne memoria, mi hanno accolto nella loro

famiglia come una nipote, mi hanno trasmesso molti valori con cui sono cresciuta e casa loro è per me una seconda casa.

Grazie al mio relatore, il professor Stefano Fogli, per aver creduto in me e per avermi costantemente seguito nella realizzazione di questa tesi.

Grazie quindi di cuore a tutte le persone che in qualche modo hanno partecipato a far di me la ragazza che sono ora e grazie a te, Simona, che guardando fin da piccola le lauree appese in sala dei tuoi genitori hai avuto sempre la determinazione e la passione per arrivare anche te a quel lontano traguardo che oggi fa di te una dottoressa.